

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSANNE BORTOLAZZO PINTO

**NRF2 COMO POTENCIAL ALVO FARMACOLÓGICO NO TRATAMENTO DA
DEPRESSÃO E DA DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADAS AO DIABETES**

**CURITIBA
2015**

ROSANNE BORTOLAZZO PINTO

**NRF2 COMO POTENCIAL ALVO FARMACOLÓGICO NO TRATAMENTO DA
DEPRESSÃO E DA DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADAS AO DIABETES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

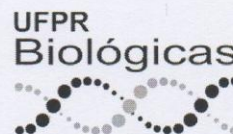
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli.

**CURITIBA
2015**

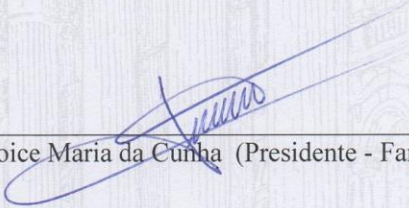


Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

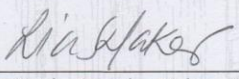


PARECER

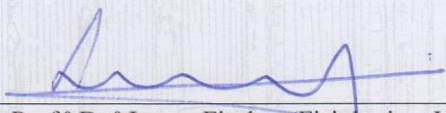
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "Via Keap1/Nrf-2 como potencial alvo farmacológico no tratamento da depressão e da dor neuropática associadas ao diabetes.", de autoria da pós-graduanda ROSANNE BORTOLAZZO PINTO sob orientação da Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha e composta por: Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Lia Sumie Nakao (Patologia Básica – UFPR) e Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Em Curitiba, 25 de junho de 2015.



Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof.^a Dr.^a Lia Sumie Nakao (Patologia Básica – UFPR)



Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR)

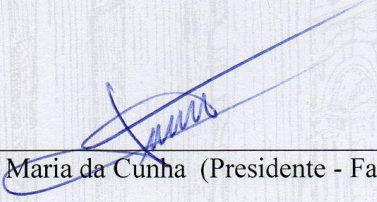


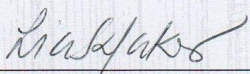
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



ATA DO JULGAMENTO DA 109ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ao vigésimo quinto dia do mês de junho do ano de dois mil e quinze, às quatorze horas, no Auditório do Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-graduanda **ROSANNE BORTOLAZZO PINTO**, intitulada "Via Keap1/Nrf-2 como potencial alvo farmacológico no tratamento da depressão e da dor neuropática associadas ao diabetes.", sob orientação da Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha e composta por: Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Lia Sumie Nakao (Patologia Básica – UFPR) e Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante trinta minutos por cada um dos membros da Banca e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final da sessão, a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. Para a publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Comissão Examinadora em Curitiba, 24 de junho de 2015.


Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR)


Prof.^a Dr.^a Lia Sumie Nakao (Patologia Básica – UFPR)


Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR)

Dedico este trabalho aos meus amados pais Roberto e Conceição como um pequeno gesto de gratidão frente a todo o amor, apoio, alegria, exemplo, doçura, entrega, e, sobretudo, por terem me ensinado e vivido a fé, por terem mostrado que, mesmo nos momentos mais difíceis da vida, tudo é possível ao que crê.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de todas as coisas, por ter me concedido a vida, por cada novo dia, pelas pessoas que pude conhecer, admirar e aprender, pela oportunidade, pelos momentos especiais, pelo aprendizado, pelo sustento, pela força, pelo crescimento, por tudo o que tenho alcançado, pelo amor imensurável e pela graça sem a qual eu nada teria.

Aos meus amados pais, Roberto e Conceição, e aos meus amados irmãos Rocianne e Rubens. Não há palavras que possam descrever como sou grata, como me sinto privilegiada por tê-los em minha vida, por serem estas grandes pessoas cujo amor me constrange, pelo apoio ilimitado, por se fazerem presentes mesmo quando fisicamente distantes, pelos incentivos, pelas conversas, pelos abraços, pelos sorrisos. Amo-os demais, sem vocês, tudo seria muito mais difícil.

Às minhas queridas orientadoras, Profa. Dra. Joice Maria da Cunha, e co-orientadora, Profa. Dra. Janaína Menezes Zanolini, pela oportunidade e confiança, pelas orientações, pelo respeito, pelo exemplo, pela consideração, pela compreensão nas dificuldades, por terem me transmitido seus preciosos conhecimentos e valores, por sempre terem um tempo para me escutar, mesmo em meio a tantos afazeres, e especialmente por terem representado mais do que minhas orientadora e co-orientadora, mas amigas. Vocês são incríveis!

À profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro, por ter transmitido seu valioso conhecimento e pelas ótimas sugestões.

À profa. Dra. Lia Sumie Nakao, por ter aceitado a parceria em nossa pesquisa, por ter nos recebido de braços abertos em seu laboratório, pela confiança e por nos apoiar de todas as formas possíveis.

À doutoranda Karime Cruz França, por também ter aceitado a parceria em nossa pesquisa e por ter sido tão solícita em todos os momentos.

À mestranda Ingrid Larissa Melo de Souza, por ter sido admirável me apoiando e ensinando quando eu muito precisava, mesmo em meio à correria de sua pesquisa, apenas por gentileza.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Anne Karoline Schreiber, Isadora Andrade Petrolini, Dayane Redivo, Eliana Adami, Caroline Machado Koprufinski, Éder Gambeta, Helen de Moraes, Carlos Henrique de Jesus, Renata Reis, Carina

Nones e Rafaela Franco Claudino por sempre me apoiarem, pela disposição em ajudar, pelos conselhos, pelas risadas, pelo ânimo, pela boa amizade e pelas boas conversas. Aprendi muito com vocês!

Às minhas queridas amigas, Sarah Aline Roza e Camila Teixeira Zavadizk, pela amizade profunda e sincera, por serem ótimas ouvintes e conselheiras, pelas boas conversas, pelo apoio, pelas orações e por tornarem meus dias muito mais divertidos. As tenho como irmãs!

Aos colegas e amigos do antigo Projeto Daniel e do Projeto Jesus na UFPR. Obrigada pelo acolhimento, pelas orações, pelos testemunhos, pelas boas amizades, pelo companheirismo e pelos encontros na hora do almoço que marcaram minha vida neste período de mestrado e dos quais já tenho saudades.

À farmacêutica-amiga Silvia Nardi Cordazzo Genari, pela simpatia diária e por sempre me ajudar quando precisei.

Aos animais, minha gratidão e respeito, pois sem eles, muitas descobertas e, sobretudo, meu trabalho não seriam possíveis.

“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que se não veem.”

Hebreus 11:1

RESUMO

O diabetes é uma doença metabólica crônica, de origem multifatorial, cuja prevalência mundial tem atingido níveis alarmantes. Este é comumente acompanhado de complicações crônicas extremamente debilitantes, dentre estas a depressão e a dor neuropática (DN), cujo mecanismo fisiopatológico envolve alterações metabólicas e danos teciduais advindos da hiperglicemia crônica. Tem sido postulado que o estresse oxidativo exerce um papel central na fisiopatologia destas complicações. Ressaltando o papel do estresse oxidativo, estudos apontam que drogas antioxidantes apresentam potencial terapêutico para o tratamento tanto da depressão quanto da DN associadas ao diabetes. Neste sentido, estudos têm apontado que em resposta a danos oxidativos associados a inúmeras patologias, o fator Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) parece ser um dos principais envolvidos na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes, além de atuar na modulação de respostas inflamatórias e imunes. Com isso, drogas que atuam por meio da ativação do fator Nrf2 podem ser promissoras no tratamento da depressão e DN associadas ao diabetes. Assim, o presente estudo tem por objetivo investigar o potencial antinociceptivo (através do teste de *Von Frey* eletrônico-VF) e antidepressivo (através do teste de nado forçado-NF) do ácido elágico, um polifenol com propriedades antioxidantes e ativador *in vitro* de Nrf2 em ratos com diabetes experimental quimicamente induzido por estreptozotocina. Para isso, animais diabéticos foram tratados por 19 dias com: 1) veículo (grupo controle); 2) imipramina (controle positivo; antidepressivo tricíclico, com ação antidepressiva, antinociceptiva e antioxidante); ou 3) ácido elágico (AE). Adicionalmente, os níveis de globais de Nrf2 foram avaliados através da técnica de *Western Blotting* (WB) em amostras de hipocampo e cordão espinhal. Nossos resultados demonstraram que animais diabéticos apresentam uma redução significativa do limiar de retirada a partir da terceira semana após a indução do diabetes, tendo um pico na quinta semana. Adicionalmente, os animais diabéticos apresentaram um aumento significativo do tempo de imobilidade (em segundos) quando comparados aos normoglicêmicos na quinta semana após a indução do diabetes, indicando o aparecimento do comportamento tipo-depressivo. Interessantemente, foi observada uma correlação positiva entre o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade tanto nos ratos diabéticos quanto nos normoglicêmicos. Os animais diabéticos tratados com AE (75 e 100 mg/kg v.o.) ou imipramina (10 mg/Kg, i.p.) apresentaram uma reversão da alodinia mecânica quando comparados aos diabéticos controle. No teste de NF foi verificado que o tratamento com AE (75 mg/kg) e imipramina (10 mg/Kg) causou um efeito tipo-antidepressivo nos animais diabéticos, sem causar prejuízo motor no teste de campo aberto. Os animais diabéticos-veículo apresentaram ainda uma redução significativa da expressão global de Nrf-2 no hipocampo e cordão espinhal, redução esta significativamente restaurada pelo tratamento com imipramina. O tratamento com AE, no entanto, reestabeleceu estes níveis no cordão espinhal, mas não no hipocampo. Em conclusão, nossos dados sugerem que o mecanismo de ação do AE e da imipramina parece estar associado à ativação da via Keap1/Nrf2 e que o AE pode apresentar potencial terapêutico para o tratamento da dor neuropática e da depressão associadas ao diabetes.

Palavras-chave: Estreptozotocina. Diabetes. Ácido elágico. Imipramina. Nrf2.

ABSTRACT

Diabetes is a chronic metabolic disease of multifactorial origin, whose global prevalence has reached alarming levels. It is usually accompanied by extremely debilitating chronic complications, such as depression and neuropathic pain (NP), whose pathophysiological mechanism involves metabolic and tissue damage arising from chronic hyperglycemia. It has been postulated that oxidative stress plays a central role in the pathophysiology of these complications. Highlighting the role of oxidative stress, studies show that antioxidant drugs have therapeutic potential for the treatment of both depression and NP. In this sense, studies have pointed out that in response to oxidative damage associated with many diseases, the factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) seems to be one of the key players in the transcription of genes encoding antioxidant enzymes, besides acting in modulating of inflammatory and immune responses as well as protection against the neurodegenerative processes. Thus, drugs that act via activation of factor Nrf2 may be promising in the treatment of depression and NP associated with diabetes. The present study aims to investigate the involvement of the Keap1 / Nrf2 pathway in the effect of ellagic acid (polyphenol with antioxidant properties, whose literature points as possible *in vitro* activator of Nrf2) on depression and neuropathic pain in rats with experimental diabetes chemically induced by streptozotocin. For this, diabetic animals were treated for 19 days with 1) vehicle (control group); 2) imipramine (positive control; tricyclic antidepressant with antidepressant, antinociceptive and antioxidant properties); or 3) ellagic acid (EA). The possible antidepressant and antinociceptive effects were evaluated by modified forced swim test (FST) and electronic Von Frey (VF), respectively, and the activation of the Keap1/Nrf2 pathway was assessed in hippocampus and spinal cord samples by Western blotting (WB) technique to determine the global Nrf2 levels. Our results showed that diabetic rats showed a significant mechanical allodynia since the second week after the diabetes induction, peaking in the fifth week. When the immobility time was evaluated in the forced swimming test, diabetic rats presented a significant increase in the immobility time at the fifth week. Interestingly, it was observed a positive correlation between mechanical allodynia and immobility time in both diabetic and in the normoglycemic animals. Diabetic animals treated with EA (75 and 100 mg/kg p.o.) and imipramine (10 mg/kg, i.p.) showed a reversal of mechanical allodynia compared to diabetic control. The FST test showed that treatment with EA (75 mg/kg) and imipramine (10 mg/kg) caused an antidepressant-like effect in the diabetic animals, without causing any motor impairment on the open field test. It was also observed that the diabetic-vehicle animals showed a significant reduction in the overall Nrf-2 expression in both tissues analysed when compared to the normoglycemic, and that treatment with EA reestablished these levels in the spinal cord, but not in the hippocampus. Imipramine reestablished these levels in both spinal cord and in hippocampus. Taken together, our data suggests a possible involvement of the Keap1/Nrf2 pathway in both EA and imipramine mechanism of action. Additionally, our data support a possible therapeutic use of EA for the treatment of neuropathic pain and depression associated with diabetes.

Key words: Streptozotocin. Diabetes. Ellagic acid. Imipramine. Nrf2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE - Ácido elágico
AG - Aferição da glicemia
AGE - Produtos finais de glicosilação avançada
ALA - Ácido alfa lipóico
ARE - Elementos de resposta antioxidante
CDDO-Im - 1- [2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9 (11) -dieno-28-oi] imidazol
CMC - Carboximetilcelulose
CT - Coleta de tecidos
DBT - Diabéticos
DN - Dor neuropática
EROS - Espécies reativas de oxigênio
FST - Forced Swimming test
GADPH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH - Glutathiona reduzida
GSSG - Glutathiona oxidada
Gst - Glutathiona S- transferase
HO-1 - Heme oxigenase 1
i.c.v. - Intracerebroventricular
i.p. - Via Intraperitoneal
IMI - Imipramina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
Keap1 - Kelch-like ECH-associated protein 1
Maf - Oncogene AS42 homólogo à proteína de fibrosarcoma músculo-aponeurótico aviário
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MMP-9 - Metaloproteinases da matriz
n. d. - Não determinado
NF - Nado Forçado
NF- κ B - Factor nuclear kappa β
NGL - Normoglicêmicos

NP – Neuropathic pain

Nqo1 - Desidrogenase de NAD (P) H, quinona 1

NQO1 - NAD(P)H quinona oxiredutase 1

Nrf2 - Nuclear factor erythroid 2-related factor

PARP - Poli ADP ribose polimerase

PKC - Proteína quinase C

PRX1 - Peroxiredoxina 1

RAGE - Receptor para os produtos finais de glicosilação avançada

Sal - Salina

sMaf - Small Maf

SOD - Superóxido dismutase

STZ - Estreptozotocina

Ub - Ubiquitina

v.o. - Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 DIABETES: PREVALÊNCIA, COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES	13
2.2. ESTRESSE OXIDATIVO NA FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO E DA DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADA AO DIABETES	14
2.2.1. Dor neuropática diabética e estresse oxidativo	16
2.2.2. Depressão e estresse oxidativo	18
2.3. TRATAMENTOS PARA A DOR NEUROPÁTICA E PARA A DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES	19
2.3.1. Tratamentos para a dor neuropática diabética	19
2.3.2. Tratamentos para a depressão associada ao diabetes	21
2.4. A VIA KEAP1/NRF2	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS	26
4.2 DROGAS	26
4.3 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES	27
4.4 TESTE DE NADO FORÇADO	28
4.5 TESTE DE CAMPO ABERTO	29
4.6 ESTIMULAÇÃO MECÂNICA (TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO)	29
4.7 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS	30
4.8 <i>WESTERN BLOTTING</i> (WB)	30
4.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5. RESULTADOS	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA E DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR STZ E SUA CORRELAÇÃO	34
5.2 EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE A NOCICEPÇÃO, SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO E SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA	36
5.3 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A NOCICEPÇÃO, SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO E SOBRE A ATIVIDADE	

LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA.....	39
5.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM IMIPRAMINA OU ÁCIDO ELÁGICO NA EXPRESSÃO GLOBAL DE NRF-2 NO CORDÃO ESPINHAL E NO HIPOCAMPO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR STZ.....	42
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ELÁGICO E IMIPRAMINA SOBRE O PESO E A GLICEMIA DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR STZ.....	44
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença metabólica em ascensão, caracterizada por hiperglicemia crônica, e cuja prevalência varia entre diferentes países correspondendo a 10% (DAVIS e GRANNER, 1996) da população geral americana e 7% (MALERBI e FRANCO, 1992) da população brasileira. Segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes (2013), o número total de diabéticos enquadrados na faixa etária entre 20 e 79 anos no mundo aumentará de 382 milhões em 2013, para 592 milhões em 2035, sendo que, no mesmo período, este aumento será de 11,9 para 19,2 milhões no Brasil. Além desta alta taxa de prevalência mundial, outro fator preocupante são as complicações que a doença acarreta, entre as quais figuram a depressão e a dor neuropática (DN). Estudos têm demonstrado a existência de uma relação bidirecional entre a depressão e o diabetes, visto que o risco de depressão em pacientes diabéticos é de 15 a 20% maior do que para a população em geral (LUSTMAN *et al.*, 1992; GAVARD *et al.*, 1993; MORISHITA, 2009) e que pessoas depressivas possuem níveis aumentados da glicemia em jejum (KAHN *et al.*, 2011). Também sabe-se que polineuropatia sensomotora simétrica distal é a forma clínica mais comum da neuropatia diabética, afetando 90% dos diabéticos (TESFAYE *et al.*, 2013), e que destes, 1 a 10% apresentarão dor (SCHESTASTSKY, 2008).

A DN afeta uma taxa significativa de diabéticos ao redor do mundo (IDF, 2013) e, no mesmo sentido, desordens depressivas são comuns em pacientes com diabetes mellitus (ALI *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2001; BARNARD *et al.*, 2006; BAUMEISTER *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2008; ROY *et al.*, 2012). No entanto, a DN é refratária aos tratamentos convencionais disponíveis (ARGOFF *et al.*, 2006; VINIK, 1999). Evidências mostram que, mesmo após diferentes abordagens terapêuticas, apenas um terço dos pacientes com dor neuropática diabética obtém alívio da dor superior a 50% (JENSEN *et al.*, 2006). Além disto, os antidepressivos também não são eficientes em diabéticos depressivos, considerando-se que, dependendo da droga, pode ser um agravamento das complicações diabéticas, como as cardiovasculares (WARRINGTON *et al.*, 1989), além de poder interferir diretamente com os níveis de glicose ou interagir com agentes hipoglicemiantes (ERENMIMOSOGLU *et al.*, 1999). Especificamente no caso da depressão, ainda há

a limitação da latência para o surgimento do efeito terapêutico desejado, sendo esta muito lenta podendo levar de semanas a meses (FAVA *et al.*, 1996; LITTLE, 2009). Assim, são necessárias novas abordagens terapêuticas a obter melhoria efetiva dessas complicações.

Tendo em vista essas limitações no tratamento da depressão e da DN associados ao diabetes e considerando o número crescente de estudos apontando o envolvimento do estresse oxi-nitrosativo (OBROSOVA *et al.*, 2005; EREN *et al.*, 2007; LUCCA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012; BUDNI *et al.*, 2013), bem como de processos neuroimunes e neuroinflamatórios na fisiopatologia do diabetes, da depressão e da DN (RAMANA *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2007), a busca por novos fármacos com ação neuroprotetora torna-se de extrema urgência. Nesse sentido a relevância do presente estudo se dá exatamente por estudar um possível mecanismo envolvendo o fator de transdução Nrf2, o qual pode ser extremamente promissor não apenas no alívio de sintomas da depressão e DN, mas também em reduzir a progressão da doença. Sabe-se que ativadores deste fator induzem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (GIRISH; PRADHAN, 2008; KIM *et al.*, 2010). De forma interessante, cabe ressaltar que compostos como o ácido elágico, que são substâncias naturais (polifenóis bioativos) presentes abundantemente em diferentes plantas, tem sido demonstrados como ativadores da via Keap1/Nrf-2. Assim, neste trabalho foi estudado em animais diabéticos se o tratamento com ácido elágico pode reverter as consequências decorrentes do diabetes nos ratos, como respostas do tipo depressiva e de DN. Mais ainda, se o mecanismo de reversão está associado à expressão de Nrf2.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES: PREVALÊNCIA, COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, consequência do déficit da produção ou ação do hormônio insulina, ou ambos, levando a uma disfunção no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (MOREIRA *et al.*, 2009). Segundo estimativas da International Diabetes Federation (2013), o número total de diabéticos com idade entre 20 e 79 anos no mundo aumentará de 382 milhões em 2013, para 592 milhões em 2035, sendo que, no mesmo período, este aumento será de 11,9 para 19,2 milhões no Brasil. Com isso, o país será o quarto no mundo com maior número de pacientes diabéticos (Atlas IDF, 2013).

Estudos apontam que o diabetes está relacionado a uma prevalência aumentada de transtornos psiquiátricos, dentre os quais a depressão merece destaque (HO *et al.*, 2011; ANDERSON *et al.*, 2001). Sabe-se que a depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais comumente observado na população em geral e com alta prevalência ao longo da vida (maior do que 16 %) (KESSLER *et al.*, 2003). Ademais, é descrito que o risco de depressão para pacientes diabéticos é cerca de 10 a 20% maior quando comparado à população em geral (LUSTMAN *et al.*, 1992; GAVARD *et al.*, 1993). A depressão, que agrava ainda mais o diabetes, é caracterizada como uma doença mental heterogênea, incapacitante e com muitos sintomas, dentre estes a perda de prazer (anedonia), sentimentos de desamparo, tristeza e desespero.

Cabe mencionar que além de complicações como a depressão, o diabetes é frequentemente acompanhado de comorbidades secundárias como retinopatia, nefropatia, cardiopatia e polineuropatia (GIACCO e BROWNLEE, 2010). De particular interesse para o presente estudo, a polineuropatia é uma das principais complicações do diabetes, afetando tanto o sistema nervoso autônomo quanto o sistema nervoso periférico (SMITH e SINGLETON, 2008) e caracteriza-se por alterações na percepção sensorial a estímulos de diferentes naturezas (i.e.

mecânicos, térmicos e/ou químicos), manifestando-se como dor espontânea (i.e. dor na ausência de qualquer estimulação), hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) e/ou alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos). Há evidências de que a dor neuropática represente um dos sintomas mais comuns e mais debilitantes em pacientes diabéticos. Sua prevalência ainda é incerta, diretamente influenciada pelo critério diagnóstico utilizado, variando de 10 (HARATI, 1996) a 46% (AHRONI *et al.*, 1994).

2.2. ESTRESSE OXIDATIVO NA FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO E DA DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADA AO DIABETES

Há um consenso de que alterações em vias metabólicas específicas, secundárias à hiperglicemia, contribuem para os danos teciduais no diabetes. Dentre estas vias, o aumento do fluxo de glicose e de outros açúcares através da via dos polióis (via aumento da atividade da aldose redutase; revisto por OATES, 2008); aumento da formação intracelular de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs); aumento na expressão de receptores para AGEs e de seus ligantes ativadores; ativação de isoformas da proteína quinase (PK) e a hiperatividade da via da hexosamina (GIACCO e BROWNLEE, 2010) figuram entre as principais.

Resumidamente, com a hiperglicemia, ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) devido ao aumento do metabolismo da glucose. Estas EROS causam danos ao DNA ativando a enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que faz polímeros de ADP-ribose os quais acumulam-se na enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), inibindo o metabolismo da glucose pela via glicolítica. Isto resulta do direcionamento da glucose excedente para ser metabolizada na via dos polióis, ao aumento do fluxo pela via ds hexosaminas, ao aumento da formação de metilglioxal (um produto da peroxidação lipídica) e ao aumento da ativação da proteína quinase C, levando aos danos teciduais hiperglicêmicos.

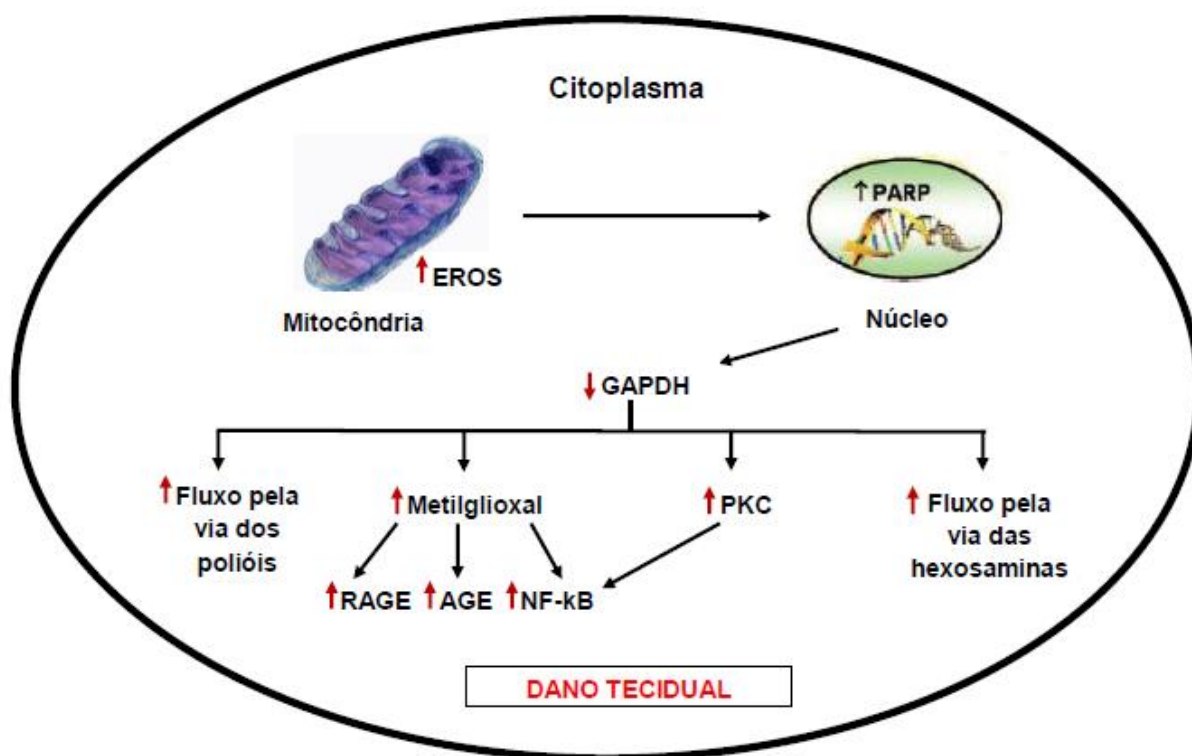


FIGURA 1. ESQUEMA MOSTRANDO O MECANISMO UNIFICADOR RESPONSÁVEL PELO DANO TECIDUAL CAUSADO PELA HIPERGLICEMIA EM UMA CÉLULA NEURAL. EROS: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli (ADP-ribose) polimerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PKC: proteína quinase C; AGE: produtos finais de glicosilação avançada; RAGE: receptor para os produtos finais de glicosilação avançada; NF- κ B: factor nuclear kappa β . FONTE: Modificada pelo autor (2015).

Há muitas evidências de que a ativação exacerbada destas vias culmina na hiperprodução mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BROWNLEE, 2005), excedendo a capacidade antioxidante endógena, o que gera estresse oxidativo. Esse aumento nos níveis estresse oxidativo e nitrosativodativo culminam, entre outros, na ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (AGTHONG *et al.*, 2002; ZATECHKA *et al.*, 2003), da poli ADP ribose polimerase (PARP) (OBROSOVA *et al.*, 2005) da ciclooxygenase-2 (RAMOS *et al.*, 2007) e do NF-KappaB (RAMANA *et al.*, 2004), aumentando mais ainda os níveis de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, as quais podem induzir danos em muitas biomoléculas (BENR *et al.*, 2012), como dano oxidativo aos lipídeos (lipoperoxidação) e ao DNA (nuclear e mitocondrial), e dano nitrosativo às proteínas (MAES *et al.*, 2009, a,b,c), comprometendo a função das mesmas e aumentando a taxa de apoptose (THANNICKAL e FANBURG, 2000).

Desta forma, o estresse oxidativo tem sido apontado como um fator comum na fisiopatologia das complicações do diabetes, incluindo a DN e a depressão (OBROSOVA *et al.*, 2005; EREN *et al.*, 2007; LUCCA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012; BUDNI *et al.*, 2013).

2.2.1. Dor neuropática diabética e estresse oxidativo

A dor caracteriza-se por uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a lesões reais ou potenciais (MERSKEY e BOGDUK, 1994) e pode ser classificada como dor nociceptiva ou como dor neuropática. A dor nociceptiva resulta de uma ativação fisiológica dos receptores ou da via dolorosa e está relacionada à lesão tecidual real ou potencial (BENNETT *et al.*, 2006).

Já a dor neuropática define-se como aquela iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo consequência da ativação anormal da via nociceptiva (fibras C e A δ e trato espinotalâmico) (MERSKEY *et al.*, 1994). O comprometimento das fibras periféricas geralmente apresenta-se como formigamento nas mãos e nos pés, além disto, os pacientes podem relatar sensação de choques elétricos paroxísticos, um aumento da sensibilidade a estímulos dolorosos (hiperalgesia) ou dor a estímulos não dolorosos (alodinia) (VOTRUBEC *et al.*, 2013) e, por fim, uma perda da sensibilidade quando as fibras nervosas são perdidas (YAGIHASHI *et al.*, 2007).

A neuropatia diabética é caracterizada pela perda progressiva das fibras nervosas, o que afeta tanto o sistemas nervoso somático, quanto o autônomo (BOULTON *et al.*, 2004). A forma clínica mais comum da neuropatia diabética é a polineuropatia sensomotora simétrica distal a qual afeta mais de 90% dos diabéticos (TESFAYE *et al.*, 2013), e destes 1-10% apresentarão dor neuropática (SCHESTASTSKY *et al.*, 2008). Aqui assume grande importância o fato de que a neuropatia diabética é a principal causa deste tipo de dor (SMITH *et al.*, 2008).

Apesar de o mecanismo patofisiológico correto da dor neuropática diabética permanecer indefinido (TESFAYE e KEMPLER, 2005), tem sido propostos alguns mecanismos centrais e periféricos. Entre os mecanismos periféricos estão

mudanças na expressão e na distribuição de canais de sódio, alteração na expressão de neuropeptídeos, brotação do sistema nervoso simpático, sensibilização periférica, alterações no fluxo sanguíneo periférico, atrofia, degeneração ou regeneração axonal, dano às fibras de pequeno calibre e alterações no fluxo glicêmico. Já entre os mecanismos centrais, estão a sensibilização central, o brotamento das fibras A β no corno da raiz dorsal e reduzida inibição das vias descendentes de controle da dor (THOMAS, 2003; UEDA e RASHID, 2003; KAPUR, 2003; BOULTON, *et al.*, 2004).

Interessante também notar que estudos recentes reforçam a hipótese de que a DN associada ao diabetes é decorrente, assim como ocorre na depressão, de inúmeros mecanismos fisiopatológicos que envolvem o aumento do estresse oxidativo e do estresse nitrosativo (PACHER *et al.*, 2005), tais como processos inflamatórios (CAMMERON e COTTER, 2008; KUMAR *et al.*, 2012), neuroimunes (QUAN *et al.*, 2007) e neurodegenerativos (RUSSEL *et al.*, 1999, 2002). Assim, estudos mostram um aumento de produtos de peroxidação lipídica, depleção de GSH (glutathiona reduzida), aumento da relação GSSG/GSH (glutathiona oxidada/glutathiona reduzida), redução da atividade da superóxido dismutase e aumento dos níveis de 8-hidroxi-guanosina em nervos periféricos de animais diabéticos (CUNHA *et al.*, 2008; STEVENS *et al.*, 2000; OBROSOVA *et al.*, 2001; COPPEY *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2003; OBROSOVA *et al.*, 2005). O envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da neuropatia diabética é reforçado por estudos clínicos e experimentais que descrevem a eficácia do tratamento com vários antioxidantes na prevenção e reversão de anormalidades bioquímicas e funcionais observadas em nervos periféricos no diabetes (BRAVENBOER *et al.*, 1992, LOVE *et al.*, 1996, CAMERON *et al.*, 1993, 1994, 2001, dentre outros). Cabe ressaltar ainda, que o estresse nitrosativo tem sido mostrado como um contribuinte de similar importância ao estresse oxidativo na fisiopatologia da neuropatia diabética (Pacher *et al.*, 2005). Corroborando esta informação foi demonstrado que o peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio, causa dano biomolecular e ativação da PARP, a qual acarreta a depleção de energia celular e a morte necrótica das células (PACHER *et al.*, 2007). Somando-se a isto, muitos estudos têm revelado que o uso de catalisadores da decomposição do peroxinitrito e de inibidores da PARP resulta na recuperação de danos funcionais e bioquímicos causados pelo diabetes no nervo ciático e no gânglio da raiz dorsal (OBROSOVA *et al.*, 2005).

2.2.2. Depressão e estresse oxidativo

Em relação à fisiopatologia da depressão, além do estresse oxi-nitrosativo, caracterizado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ou por redução dos níveis de antioxidantes (coenzima Q10, zinco, vitamina E, glutathione e glutathione peroxidase), outros mecanismos parecem contribuir de forma importante. Dentre estes, pode-se destacar o aumento de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas 1 e 6 e fator de necrose tumoral α) a ativação de resposta imune mediada por células, neurodegeneração, apoptose, redução da neurogênese e da plasticidade neuronal. Cabe ressaltar que, embora estes mecanismos possam ser ativados independentemente, há um consenso de que haja forte inter-relação entre os mesmos, e que o estresse oxidativo e nitrosativo possa ser o ponto chave (MAES *et al.*, 2009; MAES *et al.*, 2012). É sabido que os processos inflamatórios são acompanhados por uma indução das vias de estresse oxidativo e nitrosativo, os quais ocorrem quando há um desequilíbrio entre a escassez relativa da defesa anti-oxidante em relação a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (MAES *et al.*, 2011).

Tendo em vista que o cérebro possui uma pobre defesa anti-oxidante, que necessita de um elevado consumo de oxigênio e que é rico em ácidos graxos poli-insaturados oxidáveis, este torna-se propenso aos danos causados por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (VALKO *et al.*, 2007; WANG e MICHAELIS, 2010; SHICHIRI, 2014; MANGIALASCHE *et al.*, 2009). Com isso, o estresse oxidativo afeta áreas cerebrais relacionadas à patofisiologia da depressão, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (BREMNER *et al.*, 2002; FRODL *et al.*, 2002; WAYHS *et al.*, 2013, DE MORAIS *et al.*, 2014). Neste sentido, estudos clínicos têm mostrado que pacientes com depressão apresentam níveis reduzidos de GSH no córtex pré-frontal em análises *post-mortem* (KHANZODE *et al.*, 2003) e reduzidos níveis de anti-oxidantes no plasma (KHANZODE *et al.*, 2003; SARANDOL *et al.*, 2007; CUMURCU *et al.*, 2009).

Assim, muitos estudos com humanos e com animais suportam a ideia de que drogas de primeira escolha no tratamento da depressão, como os antidepressivos, exercem efeitos antioxidantes (BILICI *et al.*, 2001; HERKEN *et al.*, 2007; KHANZODE *et al.*, 2003). Nesse sentido, dados recentes de nosso grupo

demonstraram que o tratamento prolongado com o antidepressivo tricíclico imipramina além de induzir efeitos do tipo antidepressivo, restaurou o nível de antioxidantes, tais como a catalase, superóxido dismutase e glutathione reduzida, além de reduzir os níveis de lipoperoxidação em áreas implicadas na depressão (córtex pré-frontal e hipocampo) de ratos diabéticos (DE MORAIS *et al.*, 2014). Apesar da observação clínica de que os antidepressivos induzem efeito antioxidante, estudos mostram que este parece ser variável de acordo com a escolha do antidepressivo, a dose, o regime e a duração do tratamento (BENR *et al.*, 2012).

2.3. TRATAMENTOS PARA A DOR NEUROPÁTICA E PARA A DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES

2.3.1. Tratamentos para a dor neuropática diabética

O controle farmacológico da DN diabética normalmente é feito apenas de forma sintomática, através do uso de diversas classes de drogas, utilizadas como monoterapia ou em combinação, tais como antidepressivos tricíclicos, antidepressivos inibidores seletivos de receptação de serotonina, anticonvulsivantes, dentre outros.

Os antidepressivos representam a primeira linha para o tratamento da dor neuropática diabética. Entre eles, destacam-se os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e de noradrenalinatina, duloxetine e venlafaxina, e os antidepressivos tricíclicos amitriptilina e nortriptilina, os quais têm mostrado eficiência similar ao tratamento com anticonvulsivantes na dor neuropática diabética (Revisado por SCHREIBER *et al.*, 2015). No entanto, estes acarretam muitos efeitos colaterais, entre os quais os mais frequentes estão boca seca, hipotensão postural, arritmias, prejuízo cognitivo, constipação e retenção urinária (SAARTO e WIFFEN *et al.*, 2010).

Quanto aos anticonvulsivantes, apenas a gabapentina e a pregabalina apresentam-se eficazes no tratamento da dor neuropática diabética (Revisado por SCHREIBER *et al.*, 2015), e alguns estudos clínicos têm sugerido que estas produzem uma eficácia analgésica maior do que os antidepressivos tricíclicos e do

que os opioides (GILRON e FLATTERS, 2006). No entanto, estes anticonvulsivantes também causam efeitos adversos, como tonturas, sonolência, edema periférico, dor de cabeça e ganho de peso (TESFAYE *et al.*, 2013).

Os opioides são recomendados apenas com segunda ou terceira opção para o tratamento da dor neuropática diabética (PAGE *et al.*, 2012; TESTAYE *et al.*, 2013). Estudos tem revelado que opioides como o tramadol (HARATI *et al.*, 1998), a morfina (GILRON *et al.*, 2005; PELTIER *et al.*, 2014) e oxicodona (GIMBEL *et al.*, 2003; WATSON *et al.*, 2003) apresentam eficácia significativa no tratamento desta comorbidade, podendo esta classe ser associada a outras drogas como os antidepressivos amitriptilina, moclobemida e reboxetina para maior eficácia terapêutica (CEGIELSKA-PERUN *et al.*, 2014). No entanto os opioides apresentam inúmeros efeitos colaterais, tais quais náuseas, constipação, dor de cabeça e sonolência (HARATI *et al.*, 1998), dificultando a adesão ao tratamento crônico.

Também podem ser utilizados tratamentos como o creme tópico de capsaicina e o patch de lidocaína, os quais agem como analgésicos periféricos. Estudos têm demonstrado a efetividade do tratamento DN diabética com creme de capsaicina em baixas concentrações (FREEMAN *et al.*, 2013; GRONINGER *et al.*, 2012; VINIK *et al.*, 2013). O patch de lidocaína permite uma baixíssima absorção sistêmica, sendo por isso associado a outras drogas (ZILLIOX *et al.*, 2011; WOLFF *et al.*, 2010).

Por fim, é interessante ressaltar que o ácido alfa lipóico (ALA), uma substância também utilizada como alternativa terapêutica para o tratamento da DN diabética, possivelmente deve seus efeitos às potentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que possui (PATEL *et al.*, 2014). Mais ainda, ele tem sido apontado como um ativador da via Nrf2 (PETERSEN *et al.*, 2008; VAUZOUR, 2012) com efeito neuroprotetor cerebral contra neurotoxinas, habilidade de suprimir a neuroinflamação e de promover uma melhora no aprendizado e na função cognitiva (VAUZOUR, 2012). Porém este tem apresentado benefícios moderados em termos de redução da dor quando avaliado em alguns estudos clínicos (ZILLIOX e RUSSELL, 2011).

No entanto, é descrito que, mesmo após diferentes tratamentos farmacológicos, menos de um terço dos pacientes alcança alívio da DN diabética superior a 50% (JENSEN *et al.*, 2006), sendo necessárias alternativas terapêuticas (ARREOLA-ESPINO *et al.*, 2007).

2.3.2. Tratamentos para a depressão associada ao diabetes

Levando-se em conta que estudos têm demonstrado que estados depressivos podem levar à hiperglicemia (GEORGIADES *et al.*, 2007), e que, controversamente, há uma fraca relação entre a depressão e o controle glicêmico (LUSTMAN *et al.*, 2000), torna-se aceitável o atual uso conjunto de antidepressivos, hipoglicemiantes e terapia psicológica para o tratamento da depressão associada ao diabetes.

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) são a classe de antidepressivos mais estudada e prescrita para o tratamento da depressão associada ao diabetes (ZANOVELI *et al.*, 2015). Tem sido demonstrado que estes causam efeitos benéficos sobre o controle glicêmico (DHAVALÉ *et al.*, 2013), reduzindo os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) (GOMEZ *et al.*, 2001; GHAEI *et al.*, 2004; MARKOWITZ *et al.*, 2011; GOIS *et al.*, 2014), aumentando a sensibilidade do receptor de insulina (SAWKA *et al.*, 2000; BIAGETTI e CORCOY, 2013)

Entre os SSRIs, a sertralina e o escitalopram são os que exercem um efeito inibitório menos acentuado sobre as isoenzimas 3A4 e 2 D6 do sistema citocromo P-450, as quais são responsáveis pelo metabolismo de muitas drogas utilizadas no tratamento do diabetes e de comorbidades associadas, sendo por isso preferíveis em relação às outras drogas da classe (GREENBLATT *et al.*, 1999; ECHEVERRY *et al.*, 2009; GOIS *et al.*, 2014). No entanto, controversamente foi mostrado que o tratamento com SSRIs causa ganho de peso e piora parâmetros glicêmicos (revisto por BYSTRITSKY *et al.*, 2014).

Outras classes de antidepressivos, os antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, desipramina, imipramina, e nortriptilina, entre outros), os inibidores da monoamina oxidase (fenelzina, tranilcipromina, moclobemida) em geral não são indicados como primeira escolha para o tratamento da depressão associada ao diabetes, tendo em vista que interferem com o controle da glicemia e causam ganho de peso (revisto por ZANOVELI *et al.*, 2015).

Desta forma, ainda em relação ao uso de antidepressivos no tratamento da depressão, evidências clínicas mostram que dependendo do fármaco pode haver uma piora de outras complicações diabéticas, como as cardiovasculares (WARRINGTON *et al.*, 1989), além de requerer um tratamento contínuo (semanas a

meses) para alcançar a resposta terapêutica (FAVA e DAVIDSON, 1996; LITTLE, 2009). Assim como ocorre no tratamento da DN diabética, uma pequena parcela dos pacientes responde eficazmente ao tratamento com antidepressivos. Portanto, o tratamento da depressão e da DN associados ao diabetes torna-se singular e alvo de especial atenção.

Tendo em vista o importante envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo nas comorbidades associadas ao diabetes como a depressão e DN, compostos antioxidantes podem representar uma terapêutica promissora, tanto como adjuvantes ou como terapia única (SCAPAGNINI *et al.*, 2012; PERTOVAARA *et al.*, 2001).

2.4. A VIA KEAP1/NRF2

Considerando o envolvimento de mecanismos fisiopatológicos que envolvem o aumento do estresse oxidativo, tais como processos inflamatórios, neuroimunes e neurodegenerativos, na depressão e DN associada ao diabetes, compostos que atuem também como protetores nesses processos, além de antioxidantes, são de extrema urgência. Nesse sentido, a ativação do fator nuclear Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*) pode representar uma promessa.

O fator nuclear Nrf2 é um fator de transcrição que possui atividade essencial na transativação de genes que contêm elementos de resposta antioxidante em sua região promotora (TAGUCHI *et al.*, 2011). É caracterizado como um sensor do estresse oxidativo que regula a expressão de mais de 200 genes citoprotetores relacionados à neutralização ou detoxificação de metabólitos endógenos e de toxinas ambientais (COPPLE, 2012; LEWIS *et al.*, 2010; MAGESH *et al.*, 2012).

Em situações fisiológicas, o Nrf2 é regulado negativamente pela Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), a qual facilita a degradação do Nrf2 através do sistema ubiquitina-proteassoma. Todavia, em situações de danos oxidativos associados a inúmeras patologias, bem como na presença de compostos químicos com alta atividade eletrofílica, tais como radicais livres, há a dissociação da ligação Keap1-Nrf2, através de alterações em resíduos de cisteínas reativas na região de ligação da Keap1 (ITOH *et al.*, 1999). Assim, Nrf2 dissociado da Keap1 migra para o núcleo, onde recruta proteína do tipo sMaf (*small Maf*), com a qual forma um

heterodímero (TAGUCHI *et al.*, 2011). Este heterodímero liga-se a elementos de resposta antioxidante (ARE), o qual regula o DNA ativo na forma *cis* e ativa a região promotora de muitos genes que codificam enzimas de detoxificação de fase-II e antioxidantes, como a heme oxigenase 1 (HO-1), superóxido dismutase (SOD), peroxiredoxina 1 (PRX1), NAD(P)H quinona oxiredutase 1 (NQO1) e glutamato cisteína ligase (ZHU *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). De forma interessante, o Nrf2 parece também modular negativamente a expressão de muitos mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, metaloproteínas da matriz (MMP-9), ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KIM *et al.*, 2010).

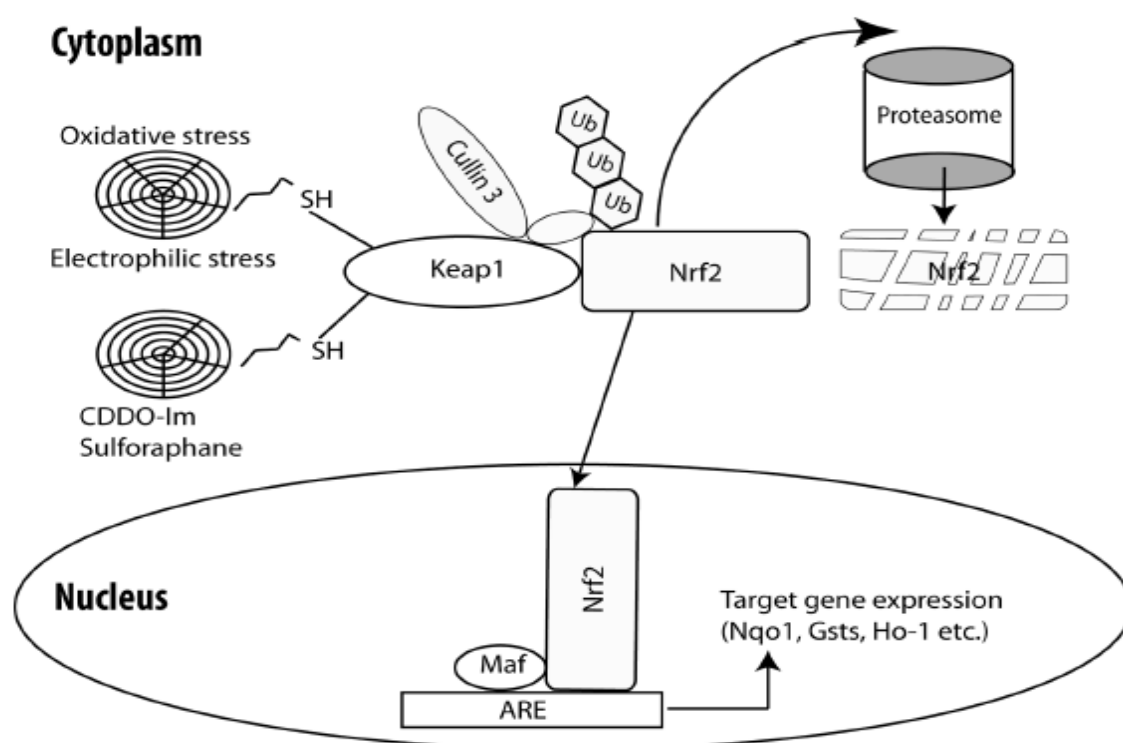


FIGURA 2. APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA KEAP1/NRF-2. Simplificadamente, a proteína Keap1 funciona como uma adaptadora para o sistema ubiquitina-proteassoma, o qual marca o fator de transdução Nrf-2 com resíduos de ubiquitina para ser degradado no proteassoma. Quando há a presença de radicais livres e/ou de substâncias eletrofílicas, estes ligam-se aos grupamentos tiol dos resíduos de cisteína presentes na proteína Keap1, a qual sofre uma alteração de conformação, liberando o Nrf-2 para migrar para o núcleo. O Nrf-2 dissociado da proteína Keap1, migra para o núcleo, forma em heterodímero com a proteína small maf, e liga-se a região promotora dos elementos de resposta anti-oxidante (AREs) no núcleo, resultando na expressão de muitas proteínas anti-oxidantes e citoprotetoras. Nrf-2: fator nuclear eritróide do tipo 2; Keap1: proteína derivada de células eritróides tipo Kelch com homologia CNC- associadas à proteína 1; CDDO-lm: 1- [2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9 (11) -dieno-28-ol] imidazol; Ub: Ubiquitina; Maf: oncogene AS42 homólogo à proteína de fibrosarcoma músculo-aponeurótico aviário; Nqo1: Desidrogenase de NAD (P) H, quinona 1; Gst: Glutathione S- transferase; Ho-1: Heme oxigenase-1. Fonte: Adaptado de CHARTOUMPEKIS e KENSLER (2013).

Dentre muitos compostos exógenos com capacidade antioxidante que parecem atuar ativando a via Keap1/Nrf2, merece destaque o ácido elágico. Interessante notar que alguns compostos polifenólicos têm sido testados em animais quanto à atividade antidepressiva em vários modelos comportamentais. Entre eles estão a curcumina e os flavonóides do cacau e do chá-verde que mostraram atividade antidepressiva em modelos animais (MESSAUDI *et al.*, 2008; SINGAL *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007).

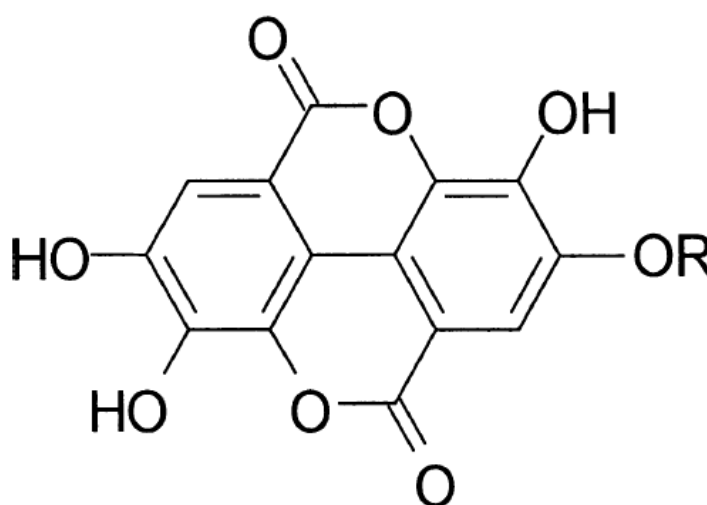


FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ELÁGICO. FONTE: Adaptado de UEDA *et al.* (2004).

O ácido elágico é um polifenol de grande interesse no presente estudo e, assim como o ALA, tem sido apontado como um ativador *in vitro* de Nrf2 com capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antifibrótica, cardioprotetora e anticancerígena (GIRISH e PRADHAN, 2008). Além disso, o ácido elágico parece ser um potencial fármaco para o tratamento de complicações do diabetes devido a capacidade de inibir *in vitro* a enzima aldolase redutase, enzima central na via dos polióis, descrita como uma das vias responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio na fisiopatologia do diabetes (SHIMIZU *et al.*, 1989; TERASHIMA *et al.*, 1990; TERASHIMA *et al.*, 1991). Ademais, a capacidade antidepressiva do ácido elágico já tem sido observada em animais normoglicêmicos, os quais apresentam melhora do quadro depressivo após o tratamento com ácido elágico por mecanismos dependentes da interação com o sistema monoaminérgico

(GIRISH *et al.*, 2012). Cabe ressaltar que foi demonstrado que o ácido elágico apresenta ainda efeitos neuroprotetores contra os danos causados pelo estresse oxidativo no nervo ciático, bem como no cérebro de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (UZAR *et al.*, 2012) e o tratamento com ácido elágico, em associação com taurina e picosídeo II, preveniu a redução da velocidade de condução motora e sensorial do nervo ciático neste modelo animal de diabetes (LIU *et al.*, 2011). Considerando os mecanismos de ação descritos acima, parece plausível hipotetizar que o ácido elágico pode representar uma alternativa promissora para o tratamento das complicações do diabetes, como a depressão e DN, o que será um dos objetivos do presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento da via Keap1/Nrf2 no efeito do ácido elágico (antioxidante) e da imipramina (antidepressivo) sobre a dor neuropática e a depressão em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com ácido elágico sobre a reversão de comportamentos relacionados com a depressão e dor neuropática em ratos diabéticos por STZ, investigando o possível envolvimento do fator de transdução Nrf2;

- Avaliar o efeito do tratamento com imipramina sobre a reversão de comportamentos relacionados com a depressão e dor neuropática em ratos diabéticos por STZ, investigando o possível envolvimento do fator de transdução Nrf2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da variedade Wistar pesando entre 180 a 220 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos em condições controladas de iluminação, com água e ração *ad libitum*. Os animais diabéticos foram mantidos em número reduzido por caixa e tiveram a maravalha trocada diariamente. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com as normas e legislações estabelecidas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFPR, sendo os animais liberados sob o número de CEUA 725.

4.2 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: ácido elágico (AE; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), imipramina (IMI; Indústria Farmacêutica Novartis, Brasil) estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) e tiopental sódico (Indústria Farmacêutica Cristália, Brasil). O ácido elágico, uma droga antioxidante aqui testada quanto seus possíveis efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo na dor neuropática e na depressão associadas ao diabetes, foi preparado como uma suspensão em carboximetilcelulose 0,5% e administrado diariamente por via oral (v.o) nas doses de 75, 100 ou 150 mg/Kg durante 19 dias (do 17^o ao 35^o dia após a

indução do diabetes). A imipramina, um antidepressivo tricíclico aqui utilizado como controle para o efeito tipo-antidepressivo, foi dissolvida em soro fisiológico estéril e administrada diariamente por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 10 mg/Kg durante 19 dias (do 17^o ao 35^o dia após a indução do diabetes). A STZ foi diluída em tampão citrato 10 mM, pH 4,5 e administrada em uma única dose de 60 mg/Kg por via i.p. no dia da indução do diabetes experimental. O tiopental sódico foi administrado em uma única dose de 200 mg/Kg i.p. no dia da eutanásia. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes da aplicação e administradas em um volume de 1 ml/kg. As doses e vias foram estabelecidas com base em estudos prévios e pilotos do nosso laboratório (ZANOVELI *et al.*, 2005; JOCA *et al.*, 2003; UZAR *et al.*, 2012; SCHREIBER *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2013; BIJJEM *et al.*, 2013).

4.3 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES

A estreptozocina (STZ) é uma toxina amplamente utilizada para induzir diabetes em animais. Através da alquilação do DNA, a STZ causa necrose das células beta-pancreáticas (LENZEN, 2008), o que conduz a um estado de diabetes insulino-dependente, a qual é acompanhada por alterações características, tais como um aumento dos níveis de glicose no sangue e na redução do ganho de peso corporal (DE MORAIS *et al.*, 2014), e as consequentes comorbidades relacionadas ao diabetes. Com isso, o diabetes induzido por STZ tornou-se um modelo conhecido de depressão (DE MORAES *et al.*, 2014; HIRANO *et al.*, 2007; KAMEI *et al.*, 2003; MIYATA *et al.*, 2004) e dor neuropática (GAO e ZHENG, 2014) em roedores.

A indução do diabetes foi realizada através da administração única de estreptozotocina (STZ; 60 mg/Kg, intraperitoneal; diluída em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) em ratos previamente submetidos a jejum de 12 horas. A confirmação do diabetes foi realizada três dias após a injeção de STZ, por meio da aplicação de um pequeno volume de sangue periférico colhido da cauda dos animais em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (*Accu-Check ActiveTM*, Roche). Foram considerados diabéticos e mantidos nos experimentos os animais cuja glicemia apresentou-se igual ou maior que 250 mg/dL. Grupos controles normoglicêmicos foram conduzidos

em paralelo, os quais receberam somente tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente).

4.4 TESTE DE NADO FORÇADO

O nado forçado é um teste de triagem comportamental amplamente utilizado para estudar novas drogas com potencial antidepressivo. O teste baseia-se na observação de ratos que são obrigados a nadar num cilindro fechado do qual não podem escapar. Por conseguinte, depois de algum tempo, eles cessam as aparentes tentativas de escapar e tornam-se imóveis, apenas mantendo os pequenos movimentos necessários para manter a cabeça acima da água. Esta imobilidade comportamental (comportamento tipo-depressivo) reflete um estado de desespero do rato, e vários antidepressivos eficazes são capazes de reduzir este tempo de imobilidade (PORSOLT *et al.*, 1978).

Neste procedimento, realizado conforme Porsolt e colaboradores (1978), os animais foram colocados individualmente para nadar em cilindros de plástico (20 cm de diâmetro por 50 cm de altura contendo 30 cm de água na temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos (pré-teste). Vinte e quatro horas após o Pré-teste, os animais foram submetidos a uma sessão de 5 minutos de nado forçado (sessão teste). Durante esta sessão foi avaliado o tempo de imobilidade total durante 5 minutos. O comportamento do tipo depressivo foi relacionado ao aumento no tempo de resposta passiva (imobilidade), enquanto o possível efeito tipo-antidepressivo dos tratamentos foi relacionado a uma redução no tempo de imobilidade apresentado pelo rato.

Entre um animal e outro, água limpa foi repostada após o cilindro ser limpo adequadamente. Após cada sessão (pré-teste e teste), os animais foram removidos e submetidos à secagem com panos limpos e secos em uma caixa separada antes de retornarem para suas caixas originais.

4.5 TESTE DE CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto foi utilizado a fim de se avaliar a possibilidade de alterações na atividade locomotora induzida pelos diferentes tratamentos, a qual pode ser alterada por fármacos que atuem no sistema nervoso central ou por relaxantes musculares. Para isto, este foi realizado conforme o método descrito por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973), que permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de uma determinada substância.

Para tal, os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena redonda dividida em 19 quadrantes, onde andaram e exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. A análise da atividade locomotora foi feita pela quantificação do número total de cruzamentos durante este período. Os dados obtidos após os diferentes tratamentos foram comparados com os respectivos controles (tratados somente com veículo).

4.6 ESTIMULAÇÃO MECÂNICA (TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO)

O teste de Von-Frey eletrônico consiste em uma técnica de se avaliar a sensibilidade de tecidos frente a um estímulo mecânico. Este tem sido utilizado há alguns anos na clínica em humanos (JENSEN *et al.*, 1986) e experimentalmente em animais (MÖLLER *et al.*, 1998).

Com isso, no presente trabalho, os animais foram avaliados quanto à alodinia mecânica por meio do teste de pressão crescente na pata de ratos, realizado com o auxílio de um aparelho anesthesiômetro eletrônico (Von Frey eletrônico, *IITC Life Science*). O Von Frey Eletrônico possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de força com a pata é feito por meio de uma ponteira de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento, para adaptação. O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, força

linearmente crescente no centro da planta da pata do rato e o estímulo cessou quando o animal apresentou resposta de retirada e sacudida da pata estimulada. Foram realizadas repetições dos estímulos até que o animal apresente três medidas similares com uma nítida resposta de "sacudida" após a retirada da pata. A intensidade da alodinia mecânica foi então quantificada pela média dos três valores expressos em gramas (força) observada antes da administração de STZ (estado basal ou zero hora), na terceira semana após a indução do diabetes e após o tratamento com as drogas em questão (quinta semana após a indução do diabetes).

4.7 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS

Um dia após a última medida de alodinia mecânica (36 dias após a indução do diabetes), os ratos foram eutanasiados por overdose de tiopental (200 mg/kg, i.p.) seguida por deslocamento cervical. O quadrante anterior do cordão espinhal (na altura das vértebras L4-L6) e o hipocampo foram coletados e armazenados num freezer a -80°C até a realização das análises de *western blotting*.

4.8 WESTERN BLOTTING (WB)

O Western Blotting foi realizado a fim de se analisar a expressão de Nrf-2 no cordão espinhal e no hipocampo dos animais após o tratamento com as drogas em questão, ou com seus respectivos veículos. Para isso, foram utilizadas as amostras (cordão espinhal e hipocampo) de quatro animais de cada grupo experimental: 4 normoglicêmicos tratados com veículo (CMC e salina), 4 diabéticos tratados com veículo (CMC e salina), e quatro diabéticos tratados com cada droga (ácido elágico e imipramina). As amostras foram homogeneizadas em uma solução de tampão RIPA contendo TRIS (50 mmol /L), NaCl (150 mmol/L), SDS (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), PMSF (0,1 mM) and EDTA (0,1 mM). Em seguida, os homogenatos foram mantidos em gelo por 30 minutos, e então sonificados duas vezes por 20 segundos

no gelo. Logo após as mesmas foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram separados e os extratos obtidos foram diluídos 10 vezes em tampão PBS 1X, então a quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e utilizando-se soro albumina bovina como padrão. Desta forma, 40ug de proteína de cada amostra foram separadas em géis de poliacrilamida a 10% por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e submetidas à reação de western blotting.

Para o *western blotting*, as proteínas dos géis foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (PVDF, BioRad) por uma hora sob corrente constante de 15V em tampão de transferência gelado (39mM de glicina, 48mM de Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol) pelo aparato Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada (durante 1 hora à temperatura ambiente) com tampão de bloqueio TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris-base e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo policlonal de coelho anti-Nrf2 (1:300, Santa Cruz Biotechnology) previamente diluído em tampão de bloqueio. Esta reação com o anticorpo primário foi realizada a 4°C por 16 horas sob constante agitação. As membranas, após três lavagens de 5 minutos com TBST, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG acoplado a HRP (1:6000, Sigma-Aldrich), diluído em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Para verificação da presença da banda de interesse, as membranas foram submetidas a novas sequencias de lavagens com TBST e incubadas com substrato adequado para reação de quimioluminescência (Westar Supernova - Cyanagen), expondo-as a filme radiográfico (Carestream) até obtenção de sinal adequado. A proteína constitutiva β -actina foi utilizada para normalização e comparação dos resultados. Os filmes foram analisados por densitometria com o software ImageJ (NIH).

4.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Dois dias após a ambientação no laboratório, todos os animais foram avaliados quanto limiar de retirada à estimulação mecânica através do Von Frey eletrônico (medida basal). Em seguida e após 12 h de jejum, os animais designados aos grupos diabéticos (DBT) receberam estreptozotocina (STZ; 60 mg/kg, i.p.). A indução do diabetes experimental foi confirmado 3 dias após a administração de STZ, e foi caracterizada pela glicemia maior ou igual a 250 mg/dL. Grupos de animais normoglicêmicos (NGL) foram conduzidos em paralelo em cada experimento. Após 2 semanas da indução do diabetes por STZ (14^o dia - terceira semana), os animais dos diferentes grupos experimentais (DBT e NGL) foram submetidos aos testes de campo aberto seguido do teste de nado forçado para avaliar a atividade locomotora e o comportamento relacionado à depressão, respectivamente. Dois dias após, os mesmos foram resubmetidos ao teste de estimulação mecânica a fim de analisar o limiar mecânico. Neste mesmo dia (17^o dia após a diabetização) e imediatamente após o teste comportamental, foram iniciados os diferentes tratamentos (ácido elágico, nas doses de 75, 100 ou 150 mg/Kg; p.o.), imipramina (10 mg/Kg, i.p.) ou seus respectivos veículos (carboximetil celulose 0,5% ou salina), os quais tiveram a duração de 19 dias. Cabe ressaltar que o tratamento com o antidepressivo tricíclico imipramina foi realizado como um controle positivo do efeito do tipo antidepressivo.

Os animais forma tratados até o 35^o dia após a diabetização. Cabe mencionar que estudos prévios do laboratório mostram que na quarta semana após a diabetização ocorre o pico de alodinia mecânica em ratos diabéticos, bem como verifica-se uma resposta do tipo depressiva mais pronunciada nesses animais (Cunha *et al.*, 2009; de Moraes *et al.*, 2014).

No 33^o dia, os ratos foram submetidos ao teste de campo aberto e de nado forçado, sendo que dois dias após (35^o dia), os mesmos foram resubmetidos ao teste de estimulação mecânica. No dia seguinte à análise comportamental de alodinia mecânica, a glicemia foi aferida e os ratos foram eutanasiados e o hipocampo e a medula espinhal foram imediatamente dissecados e armazenados no freezer a -80°C para a análise da expressão do Nrf2 por meio de western blotting.

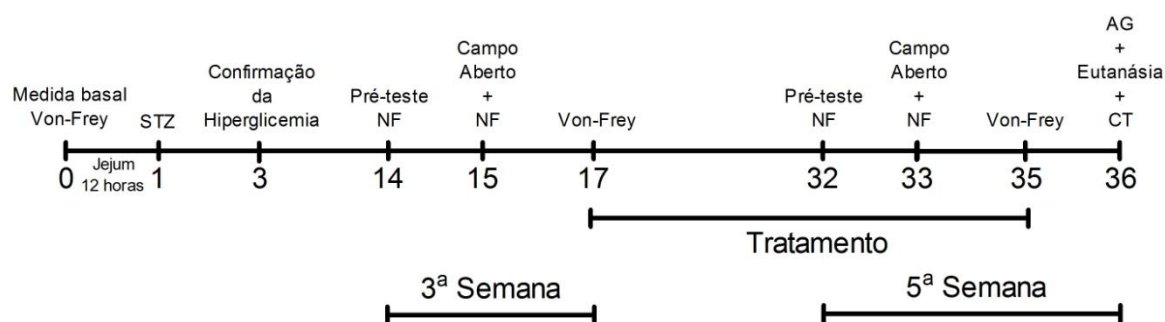


FIGURA 4. DELINEAMENTO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS. Tratamento com os veículos (salina, i.p. ou CMC 0,5% p.o.) ou com AE (75, 100 or 150 mg/Kg, v.o.) ou com imipramina (10 mg/Kg, i.p.) foi feito diariamente por 19 dias. CMC: carboximetilcelulose; AE: ácido elágico; NF: Nado forçado; AG: aferição da glicemia; CT: coleta de tecidos.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (E.P.M.) de grupos contendo de 7 a 9 animais. Os resultados obtidos após os testes comportamentais de nado forçado ou de campo aberto, assim como o ganho de peso dos animais foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via. As alterações glicêmicas dos ratos diabéticos foram analisadas por ANOVA de duas vias. Os dados obtidos a partir do teste de estimulação mecânica foram analisados por ANOVA duas vias com medidas repetidas. Quando houve diferenças estatisticamente significativas após os a realização dos testes de ANOVA, estes foram seguidos pelo pós-teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A fim de se analisar a relações entre o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade em animais NGL e DBT ($n=10$) foi utilizado o teste de coeficiente de correlação de Pearson e regressão linear multi-variada. Para isso, a intensidade de dor foi calculada subtraindo-se os valores basais do limiar de retirada da pata (obtidos antes dos procedimentos experimentais) dos valores de limiar de retirada da pata observados na quinta semana após a indução do diabetes.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA E DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR STZ E SUA CORRELAÇÃO

Como demonstrado na FIGURA 5 (painel A), quando comparados aos normoglicêmicos, os ratos diabéticos apresentaram uma redução significativa ($p<0,05$) do limiar de retirada da pata na terceira semana após a indução do diabetes, tendo um pico na quinta semana, indicando o aparecimento de hiperalgesia. Por outro lado, quando o tempo de imobilidade foi avaliado no teste de nado forçado (FIGURA 5, painel B), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais diabéticos-salina e normoglicêmicos-salina na terceira semana. Porém, na quinta semana, os animais diabéticos apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) do tempo de imobilidade (em segundos) quando comparados aos normoglicêmicos, o que indica o aparecimento do comportamento tipo-depressivo.

A fim de se investigar mais a fundo relação entre dor e depressão, ambos os grupos experimentais tiveram o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade submetidos a análises de correlação. Como mostrado na FIGURA 5 (painéis C e D), foi observada uma correlação positiva entre o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade tanto nos ratos diabéticos quanto nos normoglicêmicos (NGL $r^2=0,4344$; $p<0,05$; DBT $r^2=0,5342$; $p<0,05$).

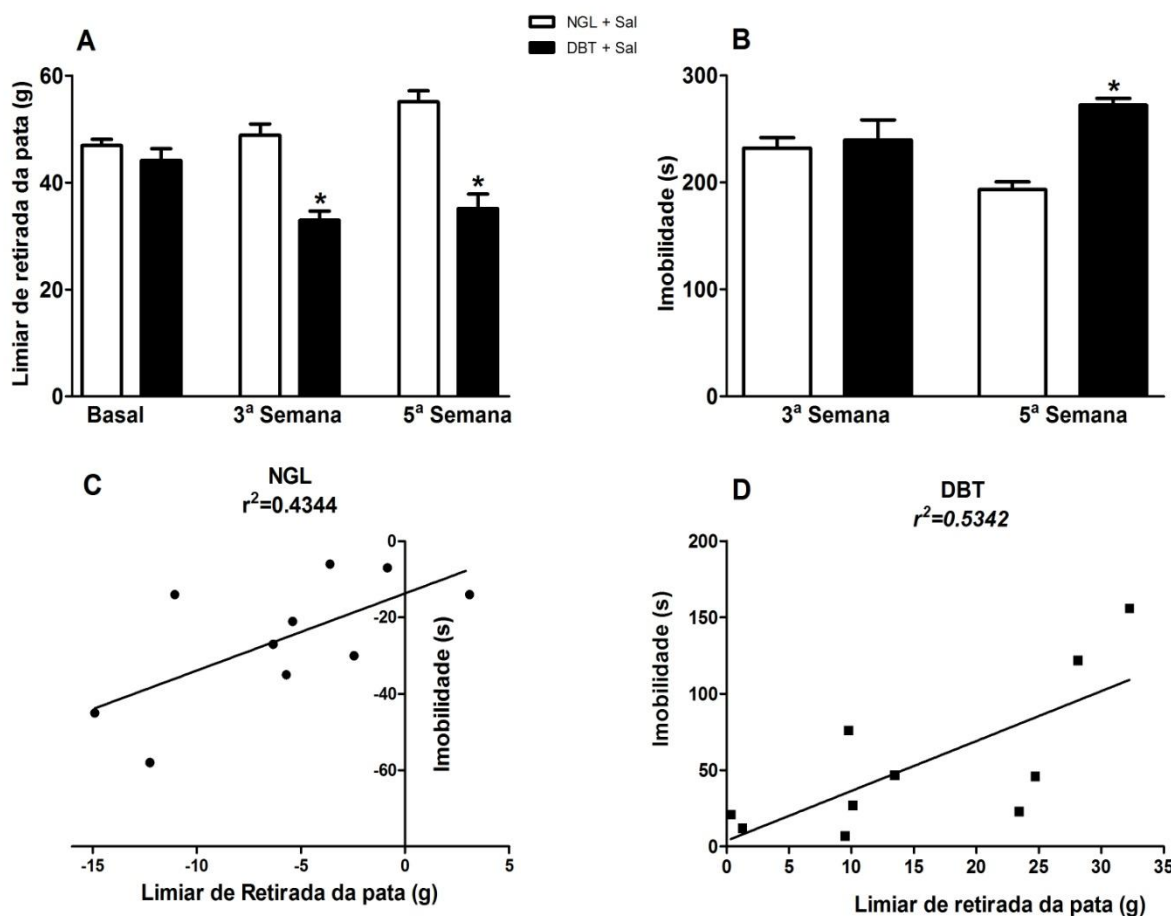


FIGURA 5. Avaliação da alodinia mecânica (A) e do comportamento tipo-depressivo (B) em ratos normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT). Cada coluna representa a média \pm E.P.M.; $n=8$. As diferenças entre grupos com relação à avaliação da alodinia mecânica (A) foi avaliada por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls; e as diferenças entre grupos com relação ao comportamento tipo-depressivo (B), foi analisada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. *representa $P<0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico. A análise de correlação entre o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade em ratos normoglicêmicos (painel C) e diabéticos (painel D). A fim de se analisar a relações entre o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade em animais NGL e DBT ($n=10$) foi utilizado o teste de coeficiente de correlação de Pearson e regressão linear multi-variada. A intensidade de dor representa o Δ entre valores de limiar de retirada da pata observados na quinta semana após a indução do diabetes e os valores basais do limiar de retirada da pata (obtidos antes dos procedimentos experimentais).

5.2 EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE A NOCICEPÇÃO, SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO E SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Novamente, foi demonstrado na FIGURA 6, que, quando comparados aos ratos normoglicêmicos, os diabéticos desenvolveram uma redução significativa ($p < 0,05$) no limiar de retirada da pata, a qual teve início na terceira semana após a indução do diabetes e permaneceu na quinta semana.

O tratamento com imipramina (10 mg/Kg, diariamente por 19 dias, iniciado após o teste de estimulação mecânica na terceira semana após a indução do diabetes) causou uma reversão significativa ($p < 0,05$) da alodinia mecânica observada nos ratos diabéticos na quinta semana (FIGURA 6).

O tratamento com imipramina também promoveu uma redução significativa do tempo de imobilidade apresentado por ratos diabéticos no teste de nado forçado, quando comparados aos normoglicêmicos (FIGURA 7).

No teste de campo aberto, conforme mostrado na TABELA 1, os ratos diabéticos apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número de cruzamentos quando comparados aos normoglicêmicos na terceira semana após a indução do diabetes.

No entanto, esta redução não foi mais observada quando os ratos diabéticos foram testados na quinta semana (ou seja, não houve mais diferença estatisticamente significativa entre os grupos de diabéticos tratados com veículo e de normoglicêmicos). No entanto, o tratamento prolongado com imipramina induziu uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de cruzamentos apresentado pelos ratos diabéticos quando comparados aos normoglicêmicos e aos diabéticos tratados apenas com veículo (TABELA 1).

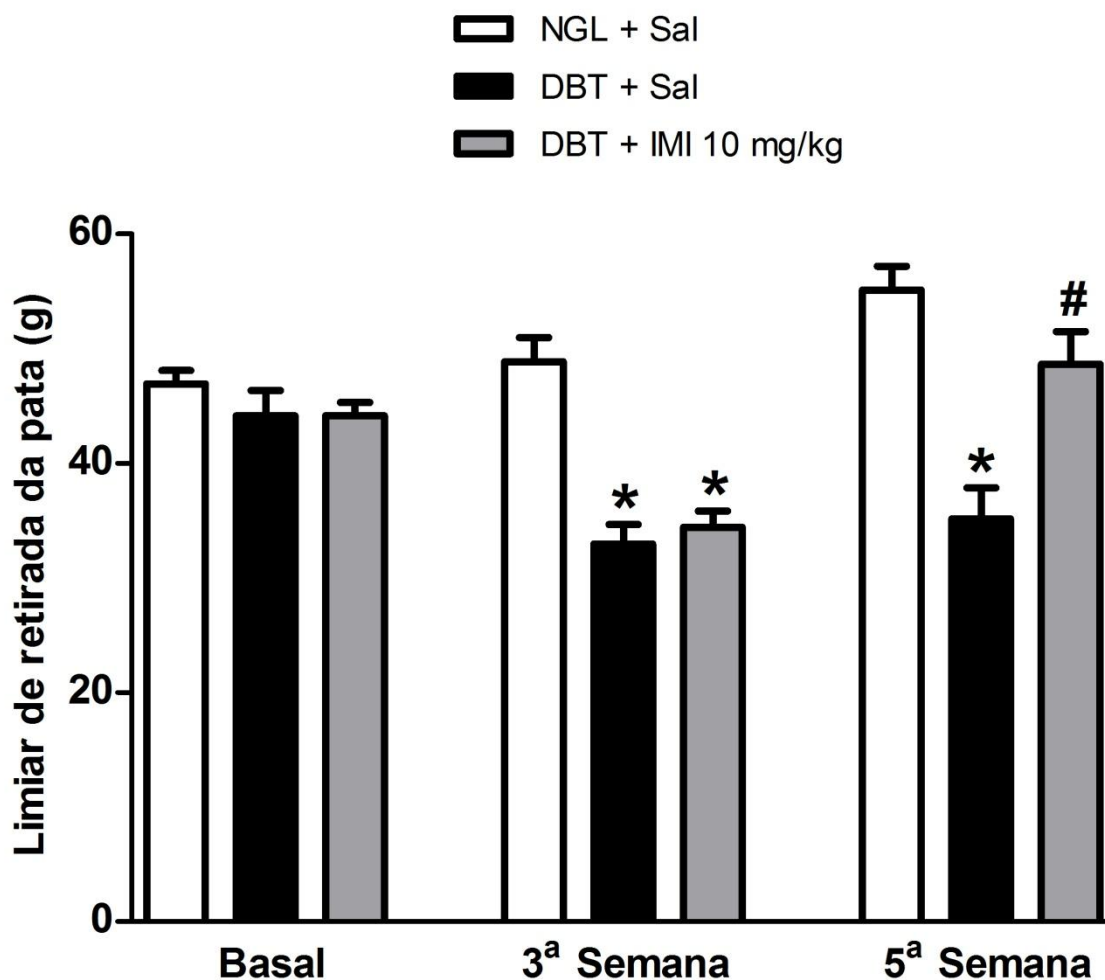


FIGURA 6. EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE LIMIAR DE RETIRADA DA PATA EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE ALODINIA MECÂNICA ANTES, 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com salina i.p. (NGL + Sal), diabéticos tratados com salina i.p. (DBT + sal), diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg, i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados representam a média \pm E.P.M do aumento ou da diminuição do limiar de retirada da pata, expresso em gramas. N=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Newlman-keuls *Diferença significativa com relação ao grupo NGL + Sal, $p<0,05$; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT + sal, $p<0,05$.

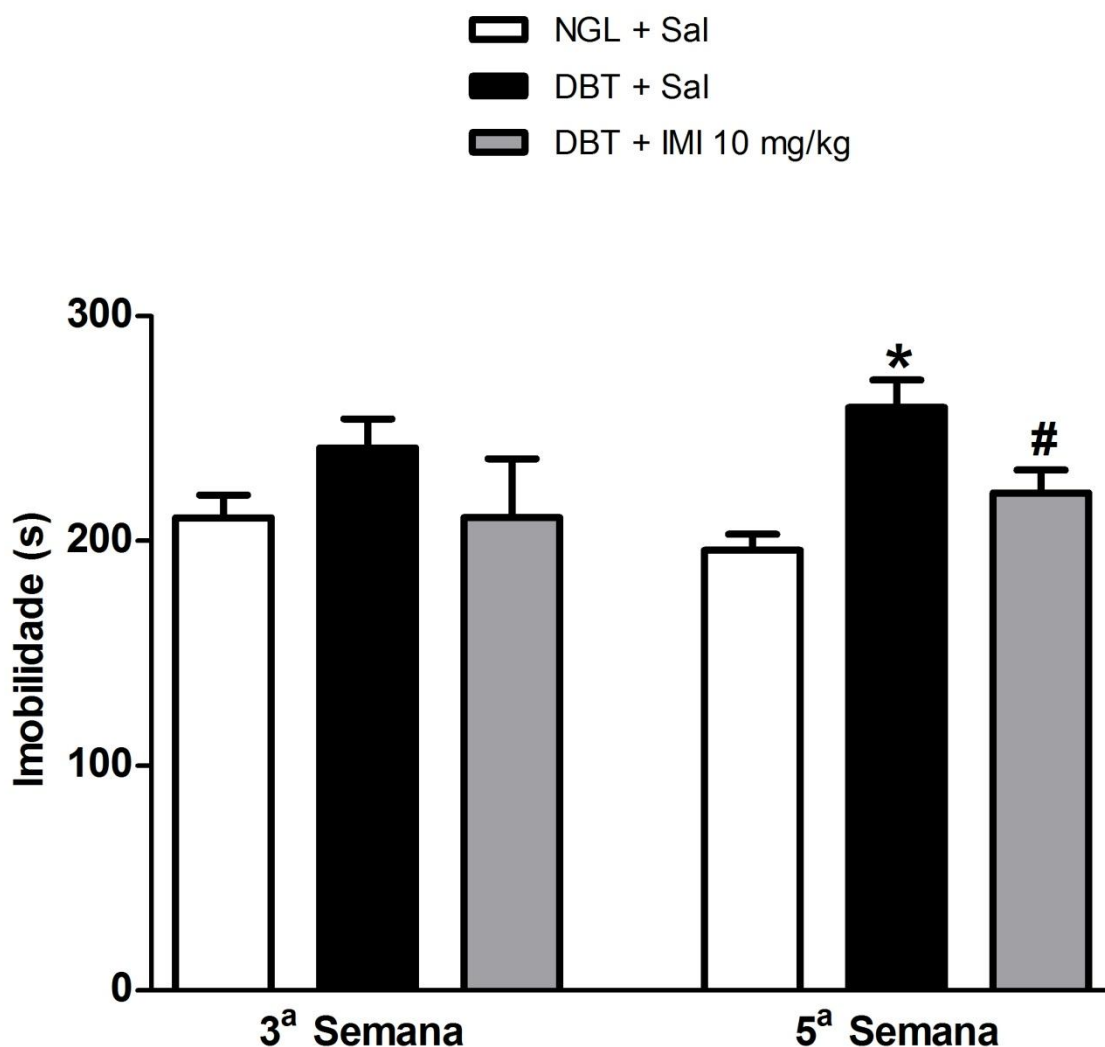


FIGURA 7. EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE NADO FORÇADO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com salina i.p. (NGL + Sal), diabéticos tratados com salina i.p. (DBT + sal), diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg, i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados representam a média \pm E.P.M do tempo de imobilidade total contado durante um período de 5 minutos, expresso em segundos. N=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-keuls. *Diferença significativa com relação ao grupo NGL + Sal, $p < 0,05$; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT + Sal, $p < 0,05$.

TABELA 1: EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CAMPO ABERTO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA.

Grupos experimentais	Número de cruzamentos	
	3ª Semana	5ª Semana
NGL + Sal	91,86 ± 14,86	92,75 ± 21,82
DBT + Sal	59,75 ± 20,89 *	69,38 ± 32,14
DBT + imipramina	69,00 ± 17,52 *	38,57 ± 21,86 * #

Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com salina i.p. (NGL + Sal), diabéticos tratados com salina i.p. (DBT + sal), diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg, i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados representam a média \pm E.P.M do número de cruzamentos contado durante um período de 5 minutos. N=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newlman-keuls *Diferença significativa com relação ao grupo NGL + Sal, $p < 0,05$; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT + Sal, $p < 0,05$. FONTE: O autor (2015).

5.3 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A NOCICEPÇÃO, SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO E SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

No teste de estimulação mecânica, novamente os animais diabéticos-veículo apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no limiar de retirada da pata quando comparados ao grupo normoglicêmicos-veículo na terceira semana após a indução do diabetes. No entanto, interessantemente, o tratamento com ácido elágico em duas das doses testadas (75 e 100 mg/kg, diariamente, por 19 dias, iniciada a partir do teste de estimulação mecânica na terceira semana) reverteu significativamente a alodinia mecânica em ratos diabéticos na quinta semana, sendo que um efeito mais pronunciado foi observado na menor dose, 75 mg/kg (FIGURA 8). No entanto, a maior dose, não apresentou efeito estatisticamente significativo na reversão da alodinia.

A dose de 75 mg/kg, mas não as maiores (100 mg/Kg e 150 mg/kg), também demonstrou-se efetiva em prevenir significativamente o aumento do tempo de imobilidade dos ratos diabéticos, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo nestes animais (FIGURA 9). No teste de campo aberto (TABELA 2), foi observado que na terceira semana após a indução do diabetes, todos os ratos diabéticos

demonstraram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número de cruzamentos quando comparados ao grupo de normoglicêmicos. Na quinta semana, todos os grupos de diabéticos, exceto os tratados com a maior dose de ácido elágico (150 mg/Kg), recuperaram a normalidade da atividade locomotora, não diferindo dos normoglicêmicos.

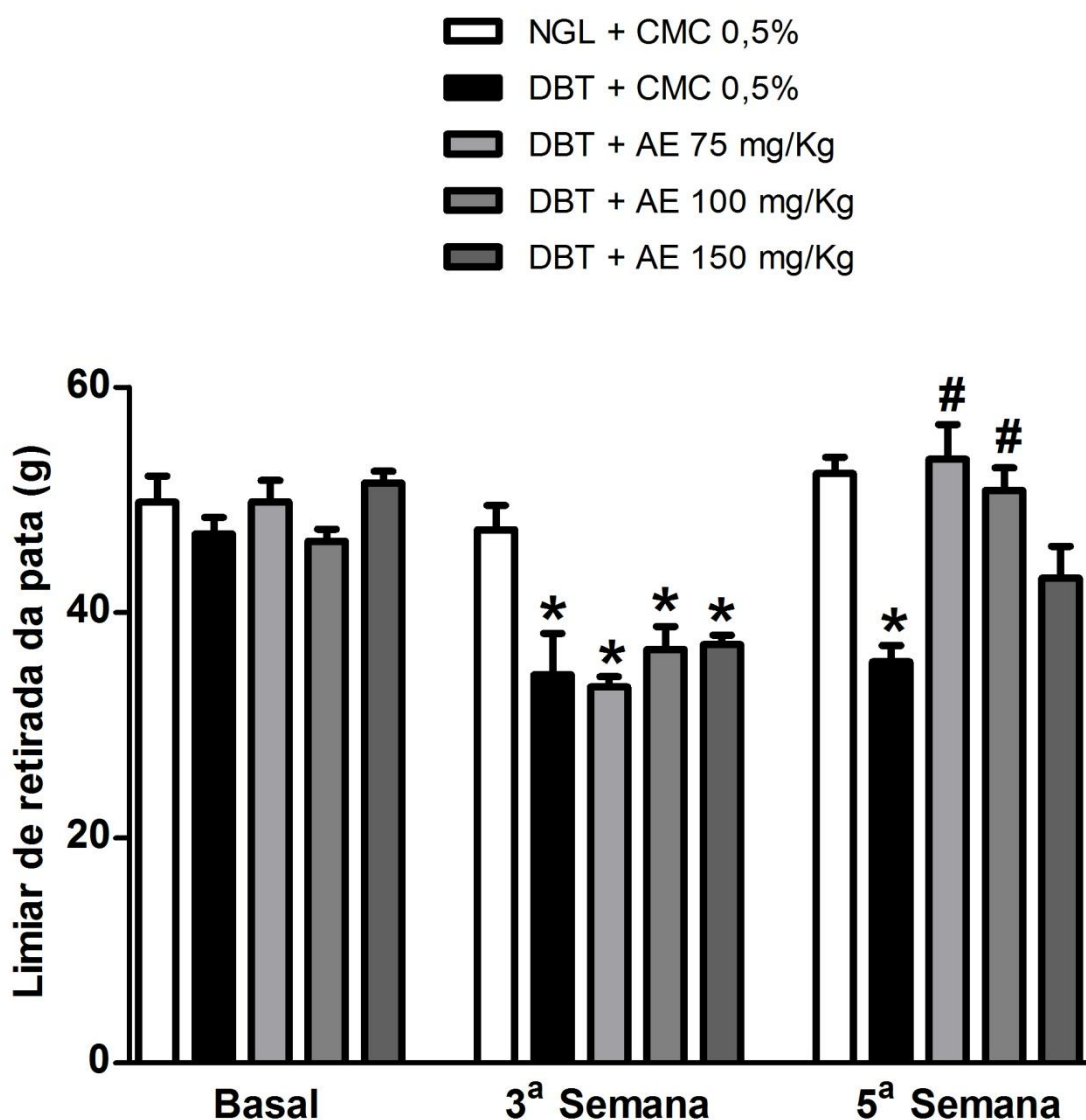


FIGURA 8. EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE LIMIAR DE RETIRADA DA PATA EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE ALODINIA MECÂNICA ANTES, 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% p.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% p.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75 mg/Kg p.o. (DBT + AE 75 mg/Kg), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg p.o. (DBT + AE 100 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 150 mg/Kg p.o. (DBT + AE 150 mg/Kg). Os dados representam a média \pm E.P.M. do aumento ou da diminuição do limiar de retirada da pata, expresso em gramas. N=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de

Newlman-keuls *Diferença significativa com relação ao grupo NGL + CMC 0,5%, $p < 0,05$; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT + CMC 0,5%, $p < 0,05$.

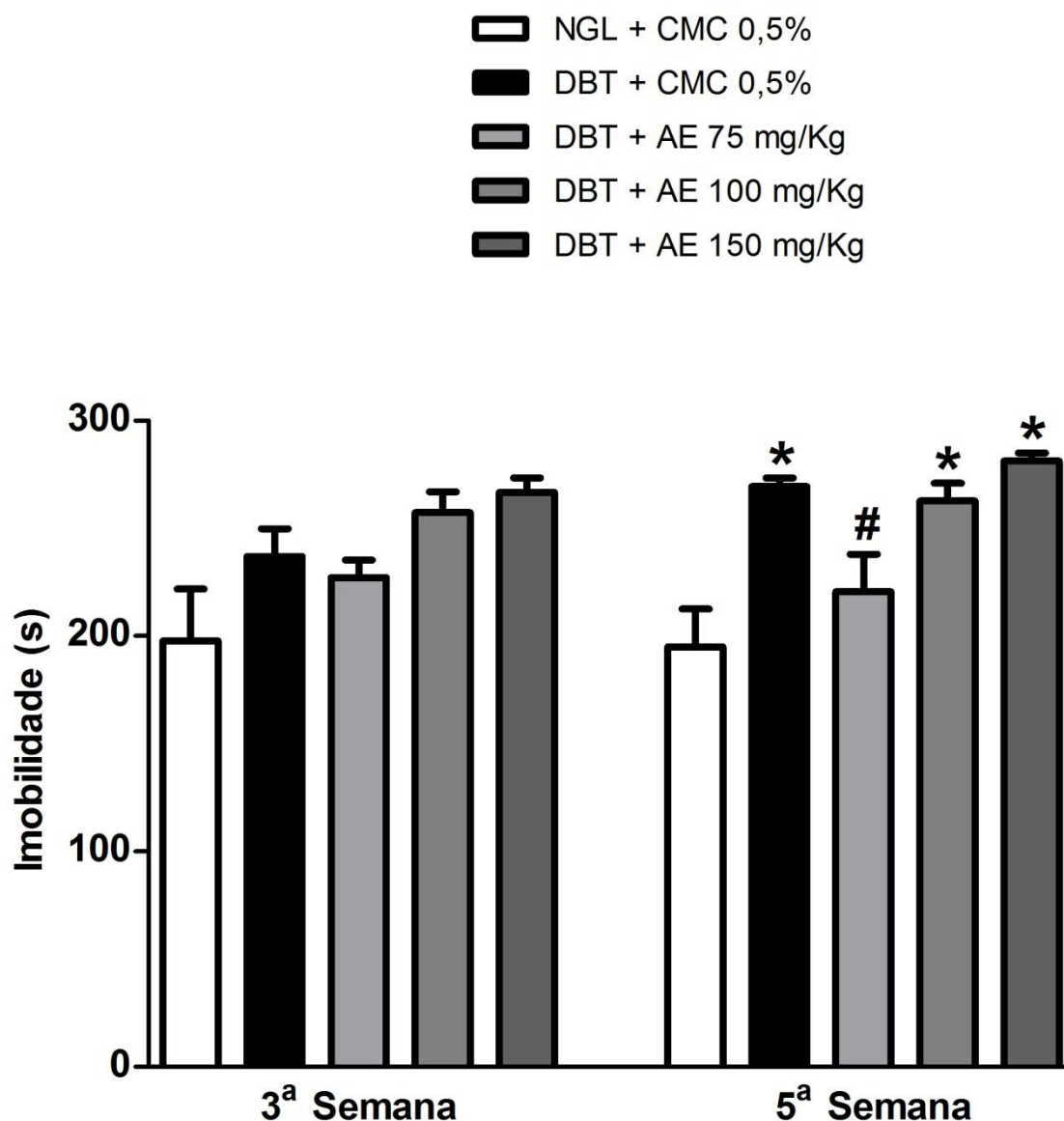


FIGURA 9. EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE NADO FORÇADO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% p.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% p.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75 mg/Kg p.o. (DBT + AE 75 mg/Kg), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg p.o. (DBT + AE 100 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 150 mg/Kg p.o. (DBT + AE 150 mg/Kg). Os dados representam a média \pm E.P.M do tempo de imobilidade total contado durante um período de 5 minutos, expresso em segundos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newlman-keuls $N=7-9$. *Diferença significativa com relação ao grupo NGL + CMC 0,5%, $p < 0,05$; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT + CMC 0,5%, $p < 0,05$.

Com relação a atividade locomotora, verificou-se que na terceira semana após a diabetização os animais diabéticos apresentaram uma redução do número de cruzamentos no teste de campo aberto (TABELA 2). Também foi observado que, na quinta semana, com exceção dos animais tratados com AE 150 mg/kg, os diabéticos controle e tratados não apresentaram alterações no número de cruzamentos.

TABELA 2. EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CAMPO ABERTO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA.

Grupos experimentais	Número de cruzamentos	
	3ª Semana	5ª Semana
NGL + CMC	107,0 ± 21,97	78,29 ± 13,44
DBT + CMC	75,38 ± 16,55 *	75,75 ± 28,53
DBT + AE 75 mg/Kg	78,5 ± 12,98 *	58,25 ± 18,09
DBT + AE 100 mg/Kg	80,13 ± 15,35 *	66,13 ± 21,36
DBT + AE 150 mg/Kg	50,86 ± 26,87 *#	16,14 ± 4,10 *#

Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% p.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% p.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75mg/Kg p.o.(DBT + AE 75 mg/Kg), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg p.o.(DBT + AE 100 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 150 mg/Kg p.o. (DBT + AE 150mg/Kg). Os dados representam a média ± E.P.M do número de cruzamentos contado durante um período de 5 minutos. N=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-keuls. *Diferença significativa com relação ao grupo NGL + CMC 0,5%, p<0,05; #Diferença significativa em relação ao grupo DBT + CMC 0,5%, p<0,05.

5.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM IMIPRAMINA OU ÁCIDO ELÁGICO NA EXPRESSÃO GLOBAL DE NRF-2 NO CORDÃO ESPINHAL E NO HIPOCAMPO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR STZ

As análises de western blotting mostraram que, quando comparados ao grupo de normoglicêmicos, os ratos diabéticos apresentaram uma redução significativa (p<0,05) da expressão global de Nrf-2 tanto no cordão espinhal (FIGURA 10, painéis A e C), quanto no hipocampo (FIGURA 10, painéis B e D). Interessantemente, o tratamento com imipramina (10 mg/kg, i.p., for 19 dias) aumentou significativamente

($p < 0,05$) a expressão global de Nrf-2 tanto no cordão espinhal (FIGURA 10, painel A) quanto no hipocampo (FIGURA 10, painel B) dos ratos diabéticos quando comparados ao grupo de diabéticos-veículo. Da mesma forma, o ácido elágico aumentou significativamente ($p < 0,05$) a expressão global de Nrf-2 no cordão espinhal (FIGURA 10, painel C), porém não foi possível verificar o mesmo no hipocampo (FIGURA 10, painel D).

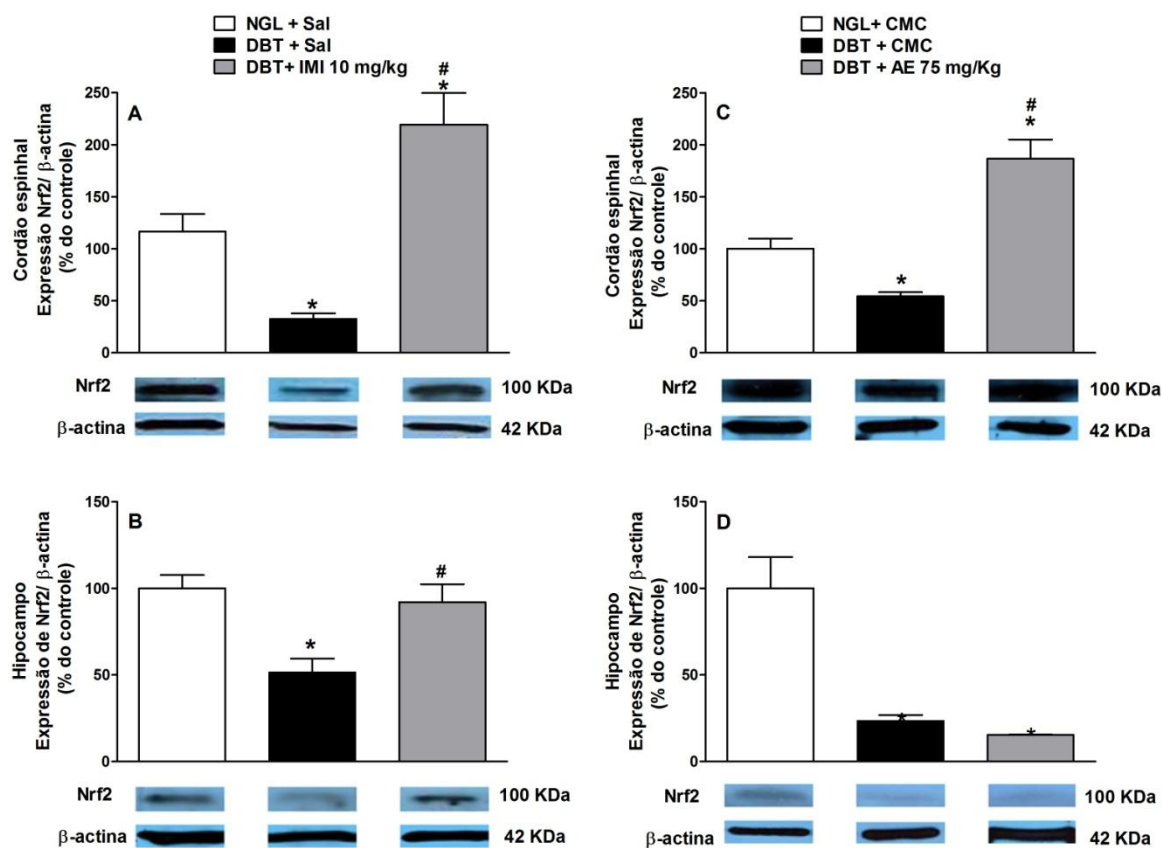


FIGURA 10. EFEITO DA IMIPRAMINA (10 MG/KG, I.P., POR 19 DIAS; PAINÉIS A E B) E DO ÁCIDO ELÁGICO (75 MG/KG, V.O., POR 19 DIAS; PAINÉIS C E D) NA EXPRESSÃO GLOBAL DE NRF-2 NO CORDÃO ESPINHAL (PAINÉIS A E C) OU NO HIPOCAMPO (PAINÉIS B E D) 36 DIAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-keuls. Cada coluna expressa a média \pm E.P.M.; $n=4$. * representa $P < 0,05$ quando comparado aos normoglicêmicos-salina ou aos normoglicêmicos CMC; # representa $P < 0,05$ quando comparados aos diabéticos-salina ou aos diabéticos-CMC.

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ELÁGICO E IMIPRAMINA SOBRE O PESO E A GLICEMIA DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR STZ

Conforme pode-se observar na TABELA 3 todos os ratos diabéticos, tanto os tratados com imipramina ou AE, quanto os tratados apenas com seus respectivos veículos, apresentaram um ganho de peso significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparados a este ganho nos animais normoglicêmicos. Com relação à glicemia, pode-se observar que todos os grupos de animais diabéticos permaneceram diabéticos ao fim do experimento, sendo que os tratamentos não causaram alterações significativas na glicemia dos diabéticos tratados com imipramina ou AE quando comparados aos diabéticos-veículo.

TABELA 3. GANHO DE PESO (G) E NÍVEIS DE GLICOSE SANGUÍNEA (mg/dL) DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Grupos experimentais	Ganho de peso (g)	Glicemia (mg/dL)	
		3 dias após STZ	36 dias após STZ
NGL + Sal	111.1 ± 6.7	n.d.	n.d.
DBT + Sal	30.7 ± 6.4*	476.9 ± 10.4	527.1 ± 14.4
DBT + imipramina	31.4 ± 5.0*	521.7 ± 8.3	483.4 ± 17.8
NGL + CMC	152.0 ± 27.9	n.d.	n.d.
DBT + CMC	26.4 ± 10.2*	501.4 ± 23.0	582.7 ± 8.9
DBT + AE 75 mg/Kg	42.6 ± 6.9*	461.1 ± 19.7	517.4 ± 20.2
DBT + AE 100 mg/Kg	32.6 ± 3.7*	500.4 ± 22.5	518.2 ± 14.1
DBT + AE 150 mg/Kg	-12.2 ± 7.2*	484.5 ± 7.6	524.6 ± 15.5

O ganho de peso foi calculado subtraindo-se o peso inicial (dia zero) dos animais do peso final dos mesmos (dia 36). A glicemia foi aferida 3 dias após a injeção i.p. de STZ a fim de se confirmar a indução do diabetes, e novamente no fim dos experimentos (36 dias após a aplicação de STZ). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-keuls. n.d.: não determinado; NGL: normoglicêmicos; DBT: diabéticos; Sal: salina; CMC: carboximetilcelulose; AE: ácido elágico. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo NGL. FONTE: O autor (2015).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo sobre a DN (PACHER *et al.*, 2005) e a depressão (MAES *et al.*, 2009; MAES *et al.*, 2012). Além disso, o stress oxidativo tem sido implicado como um fator comum na fisiopatologia das complicações do diabetes, incluindo a depressão e a DN (OBROSOVA *et al.*, 2005; EREN *et al.*, 2007; LUCCA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012; BUDNI *et al.*, 2013). Com base nisto, os antioxidantes podem representar um tratamento promissor (SCAPAGNINI *et al.*, 2012; PERTORVAARA *et al.*, 2001).

A principal conclusão deste estudo é que a administração prolongada de ácido elágico, um antioxidante conhecido que atua através da ativação de vias Keap1/Nrf2, produz efeitos antinociceptivo (75, 100 mg/kg, p.o.) e tipo-antidepressivo (75 mg/ kg, po) em ratos diabéticos.

Os nossos resultados mostraram que, na terceira semana após a indução do diabetes, os ratos diabéticos, quando comparados com os normoglicêmicos, apresentaram uma redução do limiar mecânico de retirada da pata, que permaneceu na quinta semana. Este tipo de resposta representa um comportamento de hiperalgesia. Corroborando esses resultados, estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que hiperalgesia inicia-se duas semanas após a indução do diabetes por estreptozotocina (dados não publicados). Aley e colaboradores (2002), mostraram que 24-168 h após uma dose única de STZ (40 mg/kg, iv), os ratos desenvolveram uma diminuição significativa no limiar nociceptivo. Além disso, estudos já mostraram que esta hiperalgesia pode perdurar por semanas (BĂDESCU *et al.*, 2014; BALUCHNEJADMOJARAD *et al.*, 2012).

Conforme estudos anteriores (GOMEZ *et al.*, 2000;. WAHYS *et al.*, 2010; CALETTI *et al.*, 2012; DE MORAIS *et al.*, 2014), nossos resultados mostraram que os ratos diabéticos, quando submetidos ao teste da nado forçado, mostraram um comportamento tipo-depressivo mais pronunciado do que animais normoglicêmicos, como observado pelo aumento significativo no tempo de imobilidade demonstrado por diabéticos quando comparados com ratos normoglicêmicos. Este comportamento tipo-depressivo pronunciado dos animais diabéticos foi observado na quinta semana após a indução do diabetes. Embora a maioria dos estudos demonstrem que ratos diabéticos apresentam um aumento significativo no tempo de

imobilidade entre os dias 21 (WAYHS *et al*, 2010; WAYHS *et al*, 2013) e no dia 28 (GOMEZ *et al*, 2000; CALLETI *et al*, 2012), após a indução do diabetes, nossos resultados são corroborados por Khanam & Pillai (2012), os quais mostram que esse comportamento permanece na quinta semana.

No que diz respeito à atividade locomotora, nossos resultados mostraram que, na terceira semana após a injeção de STZ, animais diabéticos-veículo apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos quando comparados aos normoglicêmicos no teste de campo aberto. Entretanto, na quinta semana, estas alterações entre o número de cruzamentos realizados por normoglicêmicos e ratos diabéticos-veículo não foram observadas. Corroborando nossos resultados, Haider e colaboradores (2013), observaram que, na segunda semana após a injeção de uma dose única de STZ de 60 mg/kg, os ratos diabéticos apresentaram uma diminuição significativa da atividade locomotora. Além disso, foi relatado que na quarta semana, o diabetes induzido por STZ não causou quaisquer alterações na atividade locomotora (DE MORAES *et al.*, 2014).

Tem sido demonstrada uma estreita relação entre dor crônica e a depressão (MERSKEY *et al.*, 1967;. GRANDE *et al.*, 1980; KRAEMLINGER *et al.*, 1983, BENBOW *et al.*, 1998; GUREJE *et al.*, 1998; Tsai, 2005; ROSEMAN *et al.*, 2007; SELVARAJAH *et al.*, 2014). Além disso, também tem sido proposta uma maior incidência de depressão em pacientes diabéticos com dor neuropática (DOBROTA *et al.*, 2014). No entanto, nenhum estudo demonstrou a relação entre a depressão e a hiperalgesia em animais diabéticos. Neste sentido, os nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar a existência de uma correlação positiva entre a hiperalgesia (limiar mecânico de retirada da pata) e comportamento tipo-depressivo (tempo de imobilidade total) em ratos diabéticos e normoglicêmicos.

Com isso, torna-se interessante o fato de que tanto a DN quanto a depressão vem sendo relacionadas ao estresse oxi-nitrosativo, bem como a processos responsáveis por seu aumento. Corroborando estas informações, recentemente Arora e Chopra (2013) propuseram que a cascata inflamatória induzida por alterações neuroquímicas pela a desregulação do estresse oxi-nitrosativo são mecanismos subjacentes às comorbidades de depressão associada ao comportamento nociceptivo em ratos.

Muitos estudos em humanos e em animais apoiam a ideia de que as drogas de escolha para o tratamento da depressão, como antidepressivos, exercem efeitos

anti-oxidantes (BILICI *et al*, 2001; HERKEN *et al.*, 2007; KHANZODE *et al.*, 2003). A imipramina foi utilizada como um controle positivo para o efeito antidepressivo. Curiosamente, este antidepressivo tricíclico amplamente utilizado para tratamentos da depressão e da DN, também tem sido relacionado a propriedades antioxidantes. De acordo com Réus e colaboradores (2010), a administração crônica de imipramina induz atividades antioxidantes no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos. Além disso, foi demonstrado que esta droga impede alterações na peroxidação no córtex pré-frontal de camundongos com comportamento anedônico induzido por estresse crônico e agudo (CLINE *et al.*, 2015).

O nosso estudo mostrou que o tratamento prolongado com a imipramina (10 mg/kg; ip) reverteu a hiperalgesia observada em ratos diabéticos. Na quinta semana após a indução do diabetes, os animais diabéticos tratados apresentaram um limiar de retirada da pata significativamente maior quando comparado aos diabéticos-salina. Embora não existam estudos sobre o tratamento da dor neuropática com imipramina em ratos com diabetes experimental induzida por STZ, este foi um resultado esperado. É bem conhecido que os antidepressivos tricíclicos apresentam uma eficácia bem estabelecida para o tratamento de dor neuropática diabética (FINNERUP *et al.*, 2005;. ATTAL *et al.*, 2006; SAARTO *et al.*, 2007). No entanto, estes causam muitos efeitos secundários (MARQUEZ *et al.*, 2006), e representam uma terapia paliativa, dificultando a adesão ao tratamento.

Como esperado, no teste de nado forçado o tratamento prolongado com imipramina (10 mg/kg, ip.) causou uma redução significativa no tempo de imobilidade observada em animais diabéticos, revelando o efeito do tipo-antidepressivo desta droga. No entanto, embora os antidepressivos representem a primeira escolha para o tratamento da depressão em pacientes diabéticos (RUBIN *et al.*, 2004), estes podem alterar os níveis de glicemia e interagir com fármacos hipoglicemiantes. Estudos indicam que o tratamento prolongado com o antidepressivo nortriptilina aumenta a glicemia em ratos diabéticos e não diabéticos, enquanto outro antidepressivo, a fluoxetina, reduz a glicemia (ERENMEMISOGLU *et al.*, 1999). Portanto, torna-se importante o estudo de novos alvos terapêuticos para o tratamento da depressão em pacientes diabéticos.

Em relação aos efeitos do tratamento com imipramina sobre a atividade locomotora, o teste de campo aberto mostrou que os animais diabéticos tratados com imipramina apresentaram uma redução no número de cruzamentos, quando

comparado aos diabéticos-salina e aos normoglicêmicos-salina. Embora o tratamento com imipramina tenha reduzido o número de cruzamentos no teste de campo aberto, sugerindo uma deficiência locomotora, o efeito do tipo-antidepressivo não foi influenciado tendo em vista que os ratos diabéticos tratados apresentaram uma redução significativa no tempo de imobilidade. Somando-se a isto, nossos resultados são corroborados por de Moraes *et al.* (2014), os quais observaram comportamentos semelhantes em ratos diabéticos tratados com imipramina e submetidos aos testes de campo aberto e nado forçado.

Presente em frutas e nozes, incluindo mirtilos, amoras, morangos, framboesas, e nozes, o ácido elágico é um agente polifenólico, extensivamente conhecido como um potente composto antioxidante (SELLAPPAN *et al.*, 2002), que também apresenta propriedades anti-inflamatórias (GIRISH e PRADHAN, 2008).

Estudos em vários modelos de dor tem demonstrado o efeito antinociceptivo do ácido elágico em animais normoglicêmicos. Recentemente foi observado que a administração aguda AE produz antinocicepção em camundongos submetidos aos testes de retirada da cauda, de contorção abdominal induzida por ácido acético (MANSOURI *et al.*, 2013) e de placa quente (MANSOURI *et al.*, 2014). Além disso, Gianok e colaboradores (2011) relataram que a administração aguda de AE exerceu um efeito anti-hiperalgésico em ratos submetidos ao modelo de dor inflamatória induzida pela administração de carragenina na pata. O mesmo efeito foi demonstrado no teste de formalina em ratos (GHORBANZADEH *et al.*, 2014).

Estes estudos apresentados previamente dão suporte aos nossos resultados. Vimos que a administração prolongada de AE nas doses de 75 e 100 mg/kg causa efeito antinociceptivo, o qual foi observado pelo aumento significativo do limiar mecânico de retirada da pata em ratos diabéticos tratados. No entanto, na dose de 150 mg/kg, este efeito não foi observado.

Observou-se também que o AE, administrado na dose de 75 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade dos ratos diabéticos tratados quando comparado com diabéticos que receberam apenas o veículo. Nossos resultados são corroborados por Francoise *et al.*, (2012), cujo trabalho revelou que o AE, quando administrado por via oral, tanto aguda como cronicamente em camundongos normoglicêmicos, reduz significativamente o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Também apoiando nosso estudo, demonstrou-se que a AE

exerce efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos a um modelo de depressão por estresse (DHINGRA e CHHILLAR, 2012).

No teste de campo aberto, os nossos resultados mostraram também que, na quinta semana, exceto os animais tratados com AE 150 mg/kg, os grupos de diabéticos tratados com AE (75 e 100 mg / kg) não apresentaram alterações no número de cruzamentos. Estes resultados são consistentes com alguns estudos recentes os quais revelaram que tanto a administração aguda (GIRISH *et al.*, 2012; MANSOURI *et al.*, 2012; MANSOURI *et al.*, 2013; MANSOURI *et al.*, 2014) quanto crônica de AE (GIRISH *et al.*, 2012) não causa alterações locomotoras.

Tendo em vista os efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo resultantes da administração prolongada AE em roedores, há evidências que a atividade antioxidante desta droga pode estar relacionada aos mesmos. Foi previamente demonstrado que a administração crônica AE (50 mg/kg, p.o., por dia, durante 21 dias) atenua o estresse oxidativo no cérebro e nervo ciático e melhora a histopatologia do cérebro em ratos com diabetes experimental induzida por SZT (UZAR *et al.*, 2012).

Porém, muitos estudos relativos à dor têm proposto que o ácido elágico atua através da ativação da via de opioide (GHORBANZADEH *et al.*, 2014;.. MANSOURI *et al.*, 2014a; MANSOURI *et al.*, 2014b). Mansouri e colaboradores (2013), utilizando os testes de retirada da cauda e de contorção abdominal induzida por ácido acético, propôs que a administração vo., ip., ou icv. de AE, em diferentes doses, causa efeitos antinociceptivos centrais e periféricos em camundongos normoglicêmicos através da ativação da mesma via envolvida na cascata subjacente aquela desencadeada através da ativação de receptores de opioides.

Por outro lado, também foi proposto que os efeitos antinociceptivos de AE podem não ser resultantes de uma estimulação direta dos receptores opioides. Um estudo realizado em camundongos submetidos ao teste da placa quente mostrou que, embora a administração repetida de AE reduza seus próprios efeitos antinociceptivos, esta bloqueia a tolerância a analgesia e a dependência física induzidas pelo tratamento com morfina. No entanto, o AE não alterou antinocicepção causada pela administração aguda de morfina no teste da placa quente (MANSOURI *et al.*, 2014).

Considerando as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do ácido elágico e a sua proeminente relação com o sistema opioide, evidências indicando

que radicais livres e prostaglandinas podem regular os efeitos agudos da morfina assim como o desenvolvimento de tolerância e dependência à mesma (BHARGAVA, 1994), tornam-se interessantes. Além disto, estudos indicam a potencial atenuação de tolerância à morfina e da síndrome de abstinência por agentes antioxidantes e inibidores das enzimas ciclooxigenase (MORI *et al.*, 2007; ABDEL-ZAHER *et al.*, 2010; POWELL *et al.*, 1999). Com isso, torna-se plausível que os efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo aqui observados após administração prolongada de AE em ratos diabéticos, estejam relacionados às propriedades anti-inflamatórias e, sobretudo, antioxidantes desta droga.

Por outro lado, considerando os efeitos do AE em transtornos depressivos, tem sido proposto o sistema de ativação monoaminérgica (sistemas serotoninérgico e noradrenérgico) em vez do sistema opióide. Girish e colaboradores (2012) mostraram evidências de que o efeito anti-imobilidade observado em camundongos normoglicêmicos submetidos ao teste de nado forçado após receberem tratamentos tanto agudo quanto prolongado de AE em três diferentes doses (25, 50 e 100 mg/kg, po), é dependente da interação com os sistemas serotoninérgicos (receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃) e noradrenérgicos (adrenoreceptores α -1 e α 2).

Estudos têm relacionado à atividade antidepressiva de compostos polifenólicos com os seus concomitantes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e monoaminérgicos (ARORA *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2013.). Raison e colaboradores (2006) propuseram que a ativação de vias inflamatórias aumenta a liberação de citocinas, as quais adentram o cérebro provocando alterações no metabolismo da serotonina e dopamina. Portanto, as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do ácido elágico continuam a mostrar-se como a base para os seus efeitos terapêuticos.

Com base nestes estudos prévios, pode-se perceber que tanto o AE quanto a imipramina possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, as quais potencialmente podem estar relacionadas aos seus efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo. Por conseguinte, pode-se considerar a possibilidade do envolvimento comum da via Keap1-Nrf2 no mecanismo de ação destes fármacos.

Tendo em vista que, tanto o tratamento com ácido elágico, quanto o tratamento com imipramina não causaram alterações significativas na glicemia e no peso dos ratos diabéticos, torna-se plausível a hipótese de que seus efeitos podem estar relacionados a ativação da via envolvida na ativação do Nrf-2. A fim de se

testar esta hipótese, foi investigada a expressão global de Nrf-2 em amostras de cordão espinhal e do hipocampo dos animais, visto que estas representam estruturas importantes relacionadas respectivamente a modulação da dor e a depressão.

Nossas análises de western blotting mostraram que os ratos diabéticos-veículo, os quais desenvolveram hiperalgesia e comportamento tipo-depressivo, também apresentaram uma redução significativa na expressão global de Nrf-2 tanto no cordão espinhal quanto no hipocampo quando comparados aos normoglicêmicos-veículo.

Corroborando nossos resultados, foi observado que células mononucleares de pacientes diabéticos tipo-2 apresentaram uma redução significativa da expressão de Nrf-2 e de HO-1 (MOZZINI *et al.*, 2015). Recentemente foi demonstrado que a deleção do fator de transcrição Nrf2 em camundongos resulta em comportamento de tipo depressivo, reduz os níveis de monoaminas (serotonina e dopamina) no córtex pré-frontal, e reduz os níveis de VEGF e sinaptofisina, enquanto que a indução do Nrf2, num modelo inflamatório da depressão induzida por LPS, proporciona efeitos tipo-antidepressivo (MARTÍN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Também foi demonstrado um aumento nos níveis dos metabólitos de dopamina e serotonina nos cérebros de camundongos knockout para Nrf2 (MURAMATSU *et al.*, 2013). Além disto, a deleção de Nrf2 num modelo de esmagamento do nervo ciático em camundongos retarda a recuperação funcional, conduz à redução da acumulação de macrófagos, causa a deposição de maiores detritos de mielina, reduz parcialmente a regeneração axonal e também diminui a remielinização axonal (ZHANG *et al.*, 2013).

Porém, controversamente tem sido mostrado que a hiperglicemia aumenta a atividade transcripcional do Nrf-2 e supra regula muitos genes regulados por ARE, os quais estão envolvidos no metabolismo de radicais livres (UNGVARI *et al.*, 2011). Esta incongruidade aparente pode ser explicada pelo fato de que nós avaliamos a expressão global de Nrf-2 e não sua atividade transcripcional, a qual é relacionada à quantidade de Nrf-2 que migra para o núcleo.

Interessantemente, o tratamento com imipramina, um antidepressivo utilizado para o tratamento da DN diabética, e que produziu efeitos antinociceptivo e tipo antidepressivo em nossos experimentos, também induziu um aumento significativo da expressão global de Nrf-2 tanto no cordão espinhal quanto no hipocampo dos ratos diabéticos quando comparados aos níveis de Nrf-2 expresso no grupo

diabéticos-salina. Corroborando nossos resultados, tem sido demonstrado que antidepressivos tricíclicos aumentam a expressão de HO-1, uma importante enzima antioxidante, em neurônios dopaminérgicos via um aumento da acumulação nuclear de Nrf-2 (LIN *et al.*, 2012).

Com relação ao tratamento com ácido elágico, foi observada que dose efetiva (75 mg/kg) para os comportamentos de hiperalgesia e tipo depressivo, causou um aumento significativo na expressão global de Nrf-2 no cordão espinhal, mas não no hipocampo dos ratos diabéticos tratados quando comparados ao grupo diabéticos-CMC. Neste sentido, experimentos *in vitro* demonstraram que o AE atua através da ativação da via Keap1-Nrf2 (Girish e Pradhan, 2008). Embora nossos resultados não tenham demonstrado um aumento da expressão global de Nrf-2 no hipocampo dos ratos diabéticos após o tratamento com AE (75 mg/kg), era esperado que houvesse este aumento, tendo em vista que a deleção de Nrf-2 tem sido relacionada ao comportamento tipo-depressivo (Martín-de-Saavedra *et al.*, 2013) em roedores, e que, no presente estudo esta dose de AE mostrou-se capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo. Além disso, foi previamente demonstrado que a administração crônica AE (50 mg/kg, p.o., por dia, durante 21 dias) atenua o estresse oxidativo e melhora a histopatologia do cérebro em ratos com diabetes experimental induzida por SZT (Uzar *et al.*, 2012).

Com isso, acredita-se que houve uma degradação das amostras de hipocampo destes animais, já que as imagens de *western blotting* relativas à expressão global de Nrf-2 no hipocampo dos ratos diabéticos tratados com AE, não permitiram resultados conclusivos, sendo, portanto, necessário que se repita o experimento, a coleta dos tecidos e as análises de WB para este fim.

7. CONCLUSÃO

Nosso trabalho sugere que animais com diabetes experimental induzido por estreptozotocina apresentam alodinia mecânica e comportamentos tipo-depressivo, bem como redução significativa da expressão global de Nrf-2 no hipocampo e no cordão espinhal. O tratamento com ácido elágico ou com imipramina foram efetivos para o tratamento da depressão e da dor neuropática associadas ao diabetes, sem causar prejuízo motor, alterações glicêmicas e nem alterações no ganho de peso em ratos com diabetes experimental induzido por estreptozotocina. O tratamento com imipramina foi efetivo em restaurar os níveis hipocampais e no cordão espinhal de animais diabéticos, enquanto que o tratamento com ácido elágico restaurou estes níveis somente no cordão espinhal. Embora preliminares, nossos dados apontam o potencial uso terapêutico do ácido elágico para o tratamento da dor e da depressão associadas ao diabetes e que o mecanismo de ação do ácido elágico e da imipramina parece estar associado à ativação da via Keap1/Nrf2.

REFERÊNCIAS

ABDEL-ZAHER, A. O.; ABDEL-RAHMAN, M. S.; ELWASEI, F. M. Blockade of nitric oxide overproduction and oxidative stress by *Nigella sativa* oil attenuates morphine-induced tolerance and dependence in mice. **Neurochem Res**, v. 35, n. 10, p. 1557-1565, 2010.

AGTHONG, S.; TOMLINSON, D. R. Inhibition of p38 MAP kinase corrects biochemical and neurological deficits in experimental diabetic neuropathy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 973, p. 359-362, 2002.

AHRONI JH, BOYKO EJ, DAVIGNON DR, PECORARO RE. The health and functional status of veterans with diabetes. **Diabetes Care**, v.17, n. 4, p. 318-321, 1994.

ALBONI, S.; BENATTI, C.; MONTANARI, C.; TASCEDDA, F.; BRUNELLO, N. Chronic antidepressant treatments resulted in altered expression of genes involved in inflammation in the rat hypothalamus. **Eur J Pharmacol**, v. 5, n. 1-3, p. 158-167, 2013.

ALDOUS, N. R.; MANN, A. M. The pathophysiology of depression. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 89, p. 937-943, 1963.

ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neuroscience**, v. 111, n. 2, p. 389-397, 2002.

ALI, S.; STONE, M. A.; PETERS, J. L., et al. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabet Med**, v. 23, n. 11, p. 1165-1173.

ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K.E.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P. J. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v.24, n.6, p. 1069-1079, 2001.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARGOFF CE, BACKONJA MM, BELGRADE MJ, BENNETT GJ, CLARK MR, COLE BE, FISHBAIN DA, IRVING GA, MCCARBERG BH, MCLEAN MJ. Consensus guidelines: treatment planning and options. Diabetic peripheral neuropathic pain. **Mayo Clin Proc**, v. 81, n. 4, p.12-25, 2005.

ARORA, V.; CHOPRA, K. Possible involvement of oxido-nitrosative stress induced neuro-inflammatory cascade and monoaminergic pathway: Underpinning the correlation between nociceptive and depressive behaviour in a rodent model. **J Affect Disord**, v. 151, n. 3, p. 1041-1052, 2013.

ARREOLA-ESPINO, R., URQUIZA-MARÍN, H., AMBRIZ-TUTUTI, M.; ARAIZA-SALDAÑA, C. I.; CARAM-SALAS, N. L.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I., MIXCOATL-ZECUATL, T.; GRANADOS-SOTO, V. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v. 577, n. 1-3, p. 203-10, 2007.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; HAANPA A. M., *et al.* EFNS Task Force. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neurophatic pain. **Eur J Neurol**, v. 13, p. 1153-1169, 2006.

BADESCU, L.; BADULESCU, O.; CIOCOIU, M.; BADESCU, M. Modulation of neuropathic pain in experimental diabetes Mellitus. **J Physiol Biochem**, v. 70, n. 2, p. 355-361, 2014.

BALUCHNEJADMOJARADA, T; ROGHANIB, M. Chronic oral epigallocatechin-gallate alleviates streptozotocin-induced diabetic neuropathic hyperalgesia in rat: involvement of oxidative stress. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 4, p. 1243-1253, 2012.

BEHR, G, A., MOREIRA, J. C. M.; FREYL, B. N. Preclinical and clinical effects os antidepressant agents: Implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

BENNETT, M.I.; SMITH, B.H.; TORRANCE, N.; LEE, A.J. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 289-94, 2006.

BHARGAVA, H. N. Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome, and self administrative behavior. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 3, p. 293-324, 1994.

BIAGETTI, B.; CORCOY, R. Hypoglycemia associated with fluoxetine treatment in a patient with type 1 diabetes. **World J Clin Cases**, v. 1, p. 169-171, 2013.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M. A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.

BRAVENBOER B, KAPPELLE AC, HAMERS FP, VAN BUREN T, ERKELENS DW, GISPEN WH. Potential use of glutathione for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat. **Diabetologia**, v. 35, n. 9, p. 813- 817, 1992.

BRAVO, D.; IBARRA, D.; RETAMAL, J.; PELISSIER, T.; LAURIDO, C.; HERNANDEZ, A.; CONSTANDIL, L. Pannexin-1: A novel participant in neuropathic pain signaling in the rat spinal cord. **Pain**. Article in press, 2014.

BREMNER, J.D.; VYTHILINGAM, M.; VERMETTEN, E.; NAZEER, A.; ADIL, J.; KHAN, S.; STAIB, L. H.; CHARNEY, D. S.. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 51, n. 4, 273-279, 2002.

BUDNI, J.; ZOMKOWSKI, A. D.; ENGEL, D.; SANTOS, D. B.; DOS SANTOS, A. A.; MORETTI, M.; VALVASSORI, S. S.; ORNELL, F.; QUEVEDO, J.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Folic acid depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Experimental Neurology**, v. 240, p. 112-121, 2013.

BYSTRITSKY, A.; DANIAL, J.; KRONEMYER, D. Interactions between diabetes and anxiety and depression: implications for treatment. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 43, 269-283, 2014.

CALETTI, G.; OLGUINS, D. B.; PEDROLLO, E. F.; BARROS, H. M.; GOMEZ, R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1525-1533, 2012.

CALLAGHAN, B. C.; CHENG, H. T.; STABLES, C. L., et al. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. . **Lancet Neurol**, v. 11, n. 6, p. 521-534, 2012.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. Potential therapeutic approaches to the treatment or prevention of diabetic neuropathy: evidence from experimental studies. **Diabet Med**, v. 10, n. 7, p. 593-605, 1993.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications. **Diabetes Metab Rev.**, v. 10, n. 3, p. 189-224, 1994.

CAMERON, N. E.; TUCK, Z.; MCCABE, L.; COTTER, M. A. Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. **Diabetologia**; v. 44, p. 1161-1169, 2001.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.. Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 60-67, 2008.

CEGIELSKA-PERUN. K.; BUJALSKA-ZADROŻNY, M.; GAŚIŃSKA, E.; MAKULSKA-NOWAK, H. E. Enhancement of antinociceptive effect of morphine by antidepressants in diabetic neuropathic pain model. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 2, p. 228-234, 2014.

CHARTOUMPEKIS, D. V.; KENSLER, T. W. New Player on An Old Field; the Keap1/Nrf2 Pathway as a Target for Treatment of Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. **Current Diabetes Reviews**; v. 9, p. 137-145, 2013.

CLINE, B. H.; ANTHONY, D. C.; LYSKO, A.; DOLGOV, O.; ANOKHIN, K, et al. Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. **Behav Brain Res**, v. 276, p. 118-129, 2015.

COLE, B. E. Diabetic peripheral neuropathic pain: recognition and management. **Pain Med**, v. 8, n. 2, p.27-32, 2007.

COPPLE, I. M. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway – a promising therapeutic target. **Advances in Pharmacology**, v. 63, p. 43-79, 2012.

CUMURCU, B.E.; OZYURT, H.; ETIKAN, I.; DEMIR, S.; KARLIDAG, R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Psychiatry Clin Neurosci**, v. 63, n. 5, p. 639-645, 2009.

CUNHA, J. M.; FUNEZ, M. L.; CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 2, p. 197-206, 2009.

CUNHA, J. M.; JOLIVALT, C. G.; RAMOS, K. M.; GREGORY, J. A.; CALCUT, N. A.; MIZISIN, A. P. Elevated lipid peroxidation and DNA oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin, and neurotrophic factors. **Metabolism**, v. 57, n. 7, p. 873-881, 2008.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M.; FERREIRA, D. M.; WERNER, M. F.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, J. M.; ZANOVELI, J. M. Pivotal role of oxidative stress in hippocampus and pre-frontal cortex on development of depressive-like behaviors in streptozotocin-diabetic rats. **Behav Brain Res**, v. 258, p. 52-64, 2014.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, n. 1, p. 66-72, 1995.

DHAHALE, H. S.; PANIKKAR, V.; JADHAV, B. S.; GHULGHULE, M.; AGARI, A. D. Depression and diabetes: impact of antidepressant medications on glycaemic control. **J Assoc Physicians India**, v. 61, p. 896-899, 2013.

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 4, p. 796-807, 2012.

DIAZ-RUIZ, A.; MALDONADO, P. D.; MENDEZ-ARMENTA, M.; JIMÉNEZ-GARCÍA, K.; SALGADO-CEBALLOS, H., et al. Activation of heme oxygenase recovers motor function after spinal cord injury in rats. **Neurosci Lett**, v. 556, p. 26-31, 2013.

DOBROTA, V. D.; HRABAC, P.; SKEGRO, D.; SMILJANIC, R.; DOBROTA, S.; PRKACIN, I. The impact of neuropathic pain and other comorbidities on the quality of life in patients with diabetes. **Health Qual Life Outcomes**, v. 12, n. 1, p. 171, 2014.

ECHEVERRY, D.; DURAN, P.; BONDS, C.; LEE, M.; DAVIDSON, M. B. Effect of pharmacological treatment of depression on A1C and quality of life in low-income Hispanics and African Americans with diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Diabetes Care**, v. 32, p. 2156-2160, 2009.

EREN, I.; NAZIROGLU, M.; DEMIRCAS, A.; CELIK, O.; UGUZ, A. C.; ALTUNBASAK, A.; OZMEN, I.; UZ, E. Venlafaxine modulates depression induced oxidative stress in brain and medulla of rat. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 3, p. 497-505, 2007.

ERENMEMISOGLU, A.; OZDOGAN, U. K.; SARAYMEN, R.; TUTUS, A. Effect of some antidepressants on glycaemia and insulin levels of normoglycaemic and alloxan-induced hyperglycaemic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 751-743, 1999.

FAN, J.; XU, G.; JIANG, T.; QIN, Y. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 10, p. 6541-6556, 2012.

FAVA, M.; DAVIDSON, K. G. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 179-200, 1996.

FINNERUP, N. B.; OTTO, M.; MCQUAY, H. J.; JESEN, T. S.; SINDRUP, S. H. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, p. 289-305, 2005.

FREEMAN, R. New and developing drugs for the treatment of neuropathic pain in diabetes. **Curr Diab Rep**, v. 13, n. 4, p. 500-508, 2013.

GAO, F.; ZHENG, Z. M. Animal models of diabetic neuropathic pain. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 122, n. 2, 2014.

FRODL, T.; MEISENZAHN, E.M.; ZETZSCHE, T.; BORN, C.; GROLL, C.; JÄGER, M.; LEINSINGER, G.; BOTTLENDER, R.; HAHN, K.; MÖLLER, H.J. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 7, p. 1112-1118, 2002.

GAVARD, J. A.; LUSTMAN, P. J.; CLOUSE, R. E. Prevalence of depression in adults with diabetes. An epidemiological evaluation. **Diabetes Care**, v. 16, n. 8, p. 1167-1178, 1993.

GEORGIADES, A.; ZUCKER, N.; FRIEDMAN, K. E., *et al.* Changes in depressive symptoms and glycemic control in diabetes mellitus. **Psychosom Med**, v. 69, p. 235-241, 2007.

GHORBANZADEH, B.; MANSOURI, M. T.; HEMMATI, A. A.; NAGHIZADEH, B.; MARD, S. A.; REZAIE, A. Involvement of L-arginine/NO/cGMP/KATP channel pathway in the peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 126, p. 116-121, 2014.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, p. 579-591, 2010.

GIANOK, J.; DANIELS, R.; GOLEMBIOWSKI, D.; KIND, P.; POST, L.; STRIKLAND, R.; GARRET, N. Investigation of the anti-inflammatory, antinociceptive effect of ellagic acid as measured by digital paw pressure via the Randall-Selitto meter in male Sprague-Dawley rats. **AANA J.**, v. 79, n. 4, p. 28-34, 2011.

GILRON, I.; BAILEY, J. M.; TU, D.; HOLDEN, R. R.; WEAVER, D. F.; HOULDEN, R. L. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. **N Engl J Med**, v. 352, n. 13, p. 1324-1334, 2005

GILRON, I.; FLATTERS, S. J. L. Gabapentin and pregabalin for the treatment for neuropathic pain: A review of laboratory and clinical evidence. **Pain Res Manage**, v. 11, S16A-29A, 2006.

GIMBEL, J. S.; RICHARDS, P.; PORTENOY, R. K. Controlled-release oxycodone for pain in diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. **Neurology**, v. 60, n. 6, p. 927-934, 2003.

GIRISH, C.; PRADHAN, S. C. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 623-632, 2008.

GIRISH, C.; RAJ, V.; ARYA, J.; BLAKRISHNAN, S. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 682, n. 1-3, p. 118-125, 2012.

GOIS, C.; DIAS, V. V.; CARMO, I., *et al.* Treatment response in type 2 diabetes patients with major depression. **Clin Psychol Psychother**, v. 21, p. 39-58, 2014.

GOMEZ, R.; BARROS, H. M. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 229-235, 2000.

GOMEZ, R.; HUBER, J.; TOMBINI, G.; BARROS, H. M. Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats. **Braz J Med Biol**, v. 34, p. 57-64, 2001.

GREENBLATT, D.J.; VON MOLTKE, L. L.; HARMATZ, J. S.; SHADER, R. I. Human Cytochromes and some newer antidepressants. Kinetics, metabolism and drugs interactions. **J Clin Psychopharmacol**, v. 19, p. 23S-35S, 1999.

GRONINGER, H., SCHISLER, R. E. Topical capsaicin for neuropathic pain # 255. **J Palliat Med.**, v.15, n. 8, p. 946-947, 2012.

GUREJE, O.; VON KORFF, M.; SIMON G. E. Persistent pain and well-being: a World Health Organization Study in Primary Care. **JAMA**, v. 280, n. 2, p. 147-151, 1998.

HAIDER, S.; AHMED, S.; TABASSUM, S.; MEMON, Z.; IKRAM, M.; HALEEM, D. J. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. **Acta Neurol Belg**, v. 113, n. 1, p. 35-41, 2013.

HARATI, Y. Diabetes and nervous system. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 325-359, 1996.

HARATI, Y.; GOOCH, C.; SWENSON, M.; EDELMAN, S.; GREENE, D.; RASKIN, P.; DONOFRIO, P.; CORNBATH, D.; SACHDEO, R.; SIU, C. O.; KAMIN, M. Double blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. **Neurology**, v. 50, n. 6, p. 1842-1846, 1998.

HASSAN, N.; EL-BASSAOSSY, H. M.; ZAKARIA, M. N. Heme oxygenase-1 induction protects against hypertension associated with diabetes: effect on exaggerated vascular contractility. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 3, p. 217-226, 2013.

HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S.; ARMUTCU, F.; OZEN, M. E.; BULUT, M.; KAP, O.; YUMRU, M.; SAVAS, H. A.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Archives of Medical Research**, v. 38, n. 2, p. 247-252, 2007.

HO, N.; BALU, D. T.; HILARIO, M. R. F.; BLENDY, J. A.; LUCKI, I. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 3, p. 702-708, 2012.

HSEU, Y. C.; CHOU, C. W.; KUMAR, K. J. S.; FU, K. T.; WANG, H. M.; HSU, L. S.; KUO, Y. H.; WU, C. R.; CHEN, S. C.; YANG, H. L. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCat) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1245-1255, 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF. Diabetes Atlas. **International Diabetes Federation**, Brussels, Belgium, 6th edition, 2013
INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF. Diabetes Atlas. **International Diabetes Federation**, Brussels, Belgium, 6th edition, 2013

ITOH, K.; CHIBA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; KATOH, Y., et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 236, n. 2, p. 313-322, 1997.

ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; ENGEL, J. D.; YAMAMOTO, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & Development**, v. 13, n. 1, p. 76-86, 1999.

IYO, A. H.; FEYISSA, A. M.; CHANDRAN, A.; AUSTIN, M. C.; REGUNATHAN, S.; KAROLEWICZ, B. Chronic corticosterone administration down-regulates metabotropic glutamate receptor 5 protein expression in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 169, n. 4, p. 1567-1574, 2010.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H.O.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v. 25, n. 3, p. 313-323, 1986.

JENSEN, T. S.; BACKONJA, M. M.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, S.; TESFAYE, S.; VALENSI, P.; ZIEGLER, D. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diab Vasc Dis Res.**, v. 3, n. 2, p.108-19, 2006.

JIN, H. Y.; KIM, S. H.; YU, H. M.; BAEK, H. S.; PARK, T. S. Therapeutic potencial of Dioscorea extract (DA-9801) in comparison with alpha lipic acid on the peripheral nerves in experimental diabetes. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, 10 p, 2013.

JOCA, S. R.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Activation of post-synaptic 5-HT(1^a) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Research**, v. 978, n. 1-2, p. 177-184, 2003.

KELLY, J. P.; WRYNN, A.S.; LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. **Pharmacol Ther**, v. 74, n.3, p. 299-316, 1997.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WNAG, P. S. The epidemiology of major depressive disorder: results from the national comorbidity survey replication (NCS-R). **Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 23, p. 3095-3105, 2003.

KHAN, A.; JAMWAL, S.; BIJJEM, k. R. .; PRAKASH, A.; KUMAR, P. Neuroprotective effect of hemeoxygenase-1/glycogen synthase kinase-3 β modulators in 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. **Neuroscience**, v. 287, p. 66-77, 2015.

KHANAM, R.; PILLAI, K. K. Effect of chromium picolinate on modified forced swimming test in diabetic rats: involvement of serotonergic pathways and potassium channels. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 98, n. 2, p. 155-159, 2006.

KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N.; KHANZODE, S. S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin reuptake inhibitors. **Redox Report**, v. 8, n. 6, p. 365-370, 2003.

KIM, H. J.; VARIZI, N. D. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **Renal Physiology: American Journal of Physiology**, v. 298, p. 662-671, 2010

KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutation Research**, v. 690, n. 1-2, p. 12-23, 2010.

KRAEMLINGER, K. G.; SWANSON, D. W.; MURUTA, T. Are patients with chronic pain depressed? **Am J Psychiatry**. v. 140, n. 6, p. 747-749, 1983.

KREIN, S. L. The effect of chronic pain in diabetes patients' self-management. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 65-70, 2005

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol. Lett**, v. 157, n. 3, p. 175-188, 2005.

KUMAR, A.; NEGI, G.; SHARMA, S. S. Suppression of NF- κ B and NF- κ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I κ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy. **Biochimie**, v. 94, n. 1158-1165, 2012.

LARGE, R. The psychiatrist and the chronic pain patient: 172 anecdotes. **Pain**, v. 9, n. 2, p. 253-263, 1980.

LEE, S. C.; HAN, S. H.; LI, J. J.; LEE, S. H.; JUNG, D. S.; KWAK, S. J.; KIM, S. H.; KIM, D. K.; YOO, T. H.; KIM, J. H.; CHANG, S. H.; HAN, D. S.; KANG, S. W. Induction of heme oxygenase-1 protects against apoptosis under diabetic conditions. **Kidney international**, v. 76, n. 8, p. 838-848, 2009.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

LEWIS, K. N.; MELE, J.; HAYES, J. D.; BUFFENSTEIN, R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. **Integrative and comparative Biology**, v. 50, n. 5, p. 829-843, 2010.

LIN, J.; BIERHAUS, A.; BUGERT, P.; DIETRICH, N.; FENH, Y.; VOM HAGEN, F.; NAWROTH, P.; BROWLEE, M.; HAMMES, H. P. Effect of R-(+)- α -lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 1089-1096, 2006.

LIN, E. H.; VON KORFF, M.; ALONSO, J.; ANGERMEYER, M. C.; ANTHONY J.; BROMET, E., et al. Mental disorders among persons with diabetes-results from the World Mental Health Surveys. **J Psychosom Res**, v. 65, n. 6, p. 571-580, 2008.

LIN, H.; YEH, W.; HUANG, B.; LIN, C.; LAI, C.; LIN, H.; LU, D. Desipramine Protects Neuronal Cell Death and Induces Heme Oxygenase-1 Expression in Mes23.5 Dopaminergic Neurons. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.

LITTLE, A. Treatment-resistant depression. **American Family Physician**, v. 80, n. 2, p. 167-172, 2009.

LIU, Q. S.; PANG, Z. R.; LIU, R.; HE, G. R.; CUI, J.; YIN, X. Y. Effective compounds group of Mongolian prescriptions BAIMAI-SAN protect against peripheral neuropathy in lower limbs of rats through neuroprotective effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 786-791, 2011.

LOVE, A.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E. Effects of the sulphhydryl donor N-acetyl-L-cysteine on nerve conduction, perfusion, maturation and regeneration following freeze damage in diabetic rats. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 26, n. 8, p. 698-706.

LUCCA,G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLO, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the brain. **Neurochemistry International**, v. 54, n. 5-6, p. 358-362, 2009.

LUSTMAN, P. J.; GRIFFITH, L. S.; GAVARD, J. A.; CLOUSE, R. E. Depression in adults with diabetes. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1631-1639, 1992.

LUSTMAN, P. J.; GRIFFITH, L. S.; FREEDLAND, K.E; KISSEL, S. S.; CLOUSE, R. E. Cognitive behavior therapy for depression in type 2 diabetes mellitus. A randomized, controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 129, p. 613-621, 1998.

MAES M., MIHAYLOVA L., KUBERA M., UYTTERHOEVEN M., VRYDAGS N., BOSMANS E. Coenzyme Q10 deficiency in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is related to fatigue, autonomic and neurocognitive symptoms and is another risk factor explaining the early mortality in ME/CFS due to cardiovascular disorder. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 30, n. 4, p. 470-476, 2009a.

MAES M., MIHAYLOVA L., KUBERA M., UYTTERHOEVEN M., VRYDAGS N., BOSMANS E. Increased 8-hydroxy-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, in major depression and myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 30, n. 6, p. 715-722, 2009b.

MAES M., MIHAYLOVA L., KUBERA M., UYTTERHOEVEN M., VRYDAGS N., BOSMANS E. Lower plasma Coenzyme Q10 in depression: a marker for treatment resistance and chronic fatigue in depression and a risk factor to cardiovascular disorder in that illness. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 30, p. 462-469, 2009c.

MAES M., YIRMYIA R., NORABERG J., BRNE S., HIBBELN J., PERINI G., KUBERA M., et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab Brain Dis**, v. 24, p 27-53, 2009d.

MAES, M.; FISAR, Z.; MEDINA, M.; SCAPAGNINI, G.; NOWAK, G.;BERK, M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 127-150, 2012.

MAGESH, S.; CHEN, Y.; HU, L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potencial preventive and therapeutic agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 4, p. 687-726, 2012.

MANGIALASCHE, F.; POLIDORI, M. C.; MONASTERO, R.; ERCOLANI, S.; CAMARDA, C.; CECCHETTI, R.; MECOCCHI, P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Res Rev**, v. 8, n. 4, p. 285-305, 2009.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Involvement of opioid receptors in the systemic and peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 120, p. 43-49, 2014.

MANSOURI, T. M.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Central and peripheral antinociceptive effects os ellagic acid in differen animal models of pain. **European Jurnal of Pharmacology**, v. 741, p. 272-280, 2014.

MARKOWITZ, S. M.; GONZALEZ, J. S.; WILKINSON, J. L.; SAFREN, S. A. A review of treating depression in diabetes: emerging findings. **Psychosomatics**, v. 52, p.1-18, 2011.

MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D.; BUDNI, J.; CUNHA, M. P.; GÓMEZ-RANGEL, V.; LORRIO, S.; DEL BARRIO, L.; LASTRES-BECKER, I.; PARADA, E.; TORDERA, R. A.; RODRIGUES, A. L. S.; CUADRADO, A.; LÓPEZ, M. G. Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2010-2022, 2013.

MEREGALLI, C.; CANTA, A.; CAROZZI, V. A.; CHIORAZZI, A.; OGGIONI, N.; GILARDINI, A.; CERESA, C.; AVEZZA, F.; CRIPPA, L.; MARMIROLI, P.; CVALETTI, G. Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiologicaland pathological study in rats. **Eur J Pain**, v. 14, n. 4, p. 343-350, 2010.

MERSKEY, H.; SPEAR, F. G. Pain, psychological and psychiatric aspects. **Bailliere Tindall and Cassel**, 1967.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. Seattle: **IASP Press**, 1994.

MESSAOUDI, M.; BISSON, J. F.; NEJDI, A.; ROZAN, P.; JAVELOT, H. Antidepressant like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 269-276, 2008.

MIJNHOUT, G. S.; KOLLEN, B. J.; ALKHALAF, A.; KLEEFSTRA, N.; BILO, H. J. G. Alpha Lipoic Acid for Symptomatic Peripheral Neuropathy in Patients with Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012, 2012.

MILLIGAN, E. D.; SLOANE, E. M.; LANGER, S. J.; HUGHENS, T. S.; JERICH, B. M.; FRANK, M. G.; MAHONEY, M. M.; CHAVEZ, R. A., LEINWAND, L. A.; WATKINS, L. R. KW, Mahoney MM, Chavez RA, Leinwand LA, Watkins LR (2006) Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain. **Pain**, v. 126, n. 1-3, p. 294-308, 2006.

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J Neurosci Methods**, v. 84, n. 1-2, p. 41-47, 1998.

MORI, T.; ITO, S.; MATSUBAYASHI, K.; SAWAGUCHI, T. Comparison of nitric oxide synthase inhibitors, phospholipase A2 inhibitor and free radical scavengers as attenuators of opioid withdrawal syndrome. **Behav.Pharmacol**, v. 18, n. 8, p. 725-729, 2007.

MOTOHASHI, H; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol. Med**, v. 10, n. 11, p. 549-557, 2004.

MOZZINI, C.; GARBIN, U.; STRANIERI, C.; PASINI, A.; SOLANI, E.; TINELLI, I. A.; COMINACINI, L.; FRATTA PASINI, A. M. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 repression in circulating cells of type2 diabetic patients without the recommended glycemic goals. **Free Radic Res.**, v. 49, n. 3, p. 244-252, 2015.

MURAMATSU, H.; KATSUOKA, F.; TOIDE, K.; SHIMAZU, Y.; FURUSAKO, S.; YAMAMOTO, M. Nrf2 deficiency leads to behavioral, neurochemical and transcriptional changes in mice. **Genes to cells**, v. 18, n. 10, p. 899-908, 2013.

OATES, P. J. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 14-36, 2008.

OBROSOVA, I. G.; PACHER, P.; SZABO, C.; ZSUZSANNA, Z.; HIROOKA, H.; STEVENS, M. J.; YOREK, M. A. Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly (ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 234-242, 2005.

OBROSOVA, I. Diabetes and the peripheral nerve. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 10, p. 931-940, 2009.

PABREJA, K.; DUA, K.; SHARMA, S.; PADI, S. S.; KULKARNI, S. K. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. **Eur J Pharmacol**, v. 661, n. 1-3, p. 15-21, 2011.

PACHER, P.; I. G. OBROSOVA; MABLEY, J. G.; SZABO, C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 267–275, 2005.

PAGE, N.; DELUCA, J.; CROWELL, K. Clinical inquiry: what medications are best for diabetic neuropathic pain? **J Fam Pract**, v. 61, n.11, p. 691-693, 2012.

PANDEY, D. K.; SHVETANK B.; JINDAL, A.; GAUTAM, B. Effect of combination of ketanserin and escitalopram on behavioral anomalies after olfactory bulbectomy: Prediction of quick onset of antidepressant action. **Indian J. Pharmacol**, v. 6, n. 6, p. 639-643, 2014.

PATEL, N.; MISHRA, V.; PATEL, P., DIKSHIT, R. K. A study of the use of carbamazepine, pregabalin and alpha lipoic acid in patients of diabetic neuropathy. **J Diabetes Metab Disord**, v. 13, n. 62, 2014

PATTI, C. L.; FRUSSA-FILHO, R.; SILVA, R. H., et al. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 4, p. 923-927, 2005.

PELTIER, A.; GOUTMAN, S. A.; CALLAGHAN, B. C. Painful diabetic neuropathy. **BMJ**, v. 348, 2014.

PERTOVAARA, A.; WEI, H.; KALMARI, J.; RUOTSALAINEN, M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. **Experimental Neurology**, v. 167, n. 2, p. 425-434, 2001.

PETERSEN, S. K.; MOREAU, R. F.; SMITH, E. J.; HAGEN, T. M. Is α -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species *in vivo*? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. **IUBMB Life**, v. 60, n. 6, p. 362-367, 2008.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2-3, p. 201-210, 1979.

POWELL, K. J.; HOSOKAWA, A.; BELL, A.; SUTAK, M.; MILINE, B.; QUIRION, R.; JHAMANDAS, K. Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 3, p. 631-644., 1999.

QUAN, Y.; DU, J.; WANG, X. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF-KappaB pathways. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 14, p. 3150-3159, 2007.

RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol**, v. 27, n. 1, p. 24-31, 2006.

RAMAMOORTHY R.; RADHAKRISHNAN, M.; BORAH, M. Antidepressant-like effects of serotonin type-3 antagonist, ondansetron: an investigation in behaviour-based rodent models. **Behav Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 29-40, 2008.

RAMANA, K. V.; FRIEDRICH, B.; SRIVASTAVA, S.; BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K. Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. **Diabetes**, v. 53, p. 2910-2920, 2004.

RAMOS, K. M.; JIANG, Y.; SVENSSON, C. I.; CALCUTT, N. A. Pathogenesis of spinally mediated hyperalgesia in diabetes **Diabetes**, v. 56, p. 1569-1576, 2007.

RATHMANN, W.; GIANI, G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, p. 1047-1053, 2004.

RÉUS, G. Z.; STRINGARI, R. B.; DE SOUZA, B.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZOOL, F., et al. Harmin and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 5, p. 325-331, 2010.

ROSEMAN, T.; BACKENSTRASS, M.; JOEST, K., et al. Predictors of depression in a sample of 1,021 primary care patients with osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 57, n. 3, p. 415-422, 2007.

ROSSI, S.; D'AMICO, M.; CAPUANO, A.; ROMANO, M.; PETRONELLA, P.; DI FILIPPO, C. Streptozotocin-Induced diabetes leads to persistent inflammation and tissue damage following uveitis due to reduced levels of ciliary body heme oxygenase-1. **Mediators Inflamm**, v. 2006, n. 4, 2006.

ROY, T.; LLOYD, C. E. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J Affect Disord*, v. 142, s. 8-21, 2012. **J Affect Disord**, 2012 Oct;142 Suppl:S8-21.

RUSSELL, J. W.; SULLIVAN, K. A.; WINDEBANK, A. J.; HERMANN, D. N.; FELDMAN, E. L. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. **Neurobiology of Disease**, v. 6, n. 5, p. 347-363, 1999.

RUSSELL, J. W.; GOLOVOY, D.; VINCENT, A. M.; MAHENDRU, P.; OLZMANN, J. A.; MENTZER, A.; FELDMAN, E. L. High glucose induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction of neurons. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 16, n. 13, p. 1738-1748, 2002.

SAARTO, T; WIFFEN, P. J. Antidepressants for neuropathic pain. **Cochrane Database Syst Rev**. v. 4, CD005454, 2007.

SAARTO, T; WIFFEN, P. J. Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 81, p. 1372-1373, 2010.

SANDIREDDY, R.; YERRA, V. G.; ARETI, A.; KOMIRISHETTY, P.; KUMAR, A. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Futuristic Strategies Based on These Targets. **International Journal of Endocrinology**, p.1-20, 2014.

SARANDOL, A.; SARANDOL, E.; EKER, S.S.; ERDINC, S.; VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Hum Psychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 67-73, 2007.

SAWKA, A. M.; BURGART, V.; ZIMMERMAN, D. Loss of hypoglycemia awareness in an adolescent with type 1 diabetes mellitus during treatment with fluoxetine hydrochloride. **J Pediatr**, v. 136, p. 394-396, 2000.

SCAPAGNINI, G.; DAVINELLI, S.; DRAGO, F.; DE LORENZO, A.; ORIANI, G. Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? **CNS Drugs**, v. 26, n. 6, p. 477-490, 2012.

SCHESTATSKY, P. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. **HCPA**, v. 28, n. 3, p. 177-187, 2008.

SCHREIBER, A. K.; NEUFELD, M.; JESUS, C. H. A.; CUNHA, J. M. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1286-1297, 2012.

SCHREIBER, A. K.; NONES, C. F. M.; REIS, R. C.; CHICHORRO, J. C.; CUNHA, J. M. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, 2015.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SELVARAJAH, D.; CASH, T.; SANKAR, A.; THOMAS, L.; DAVIES, J.; CACHIA, E.; GANDHI, R.; WILKINSON, I. D.; WILKINSON, N.; EMERY, C. J.; TESFAYE, S. The contributors of emotional distress in painful diabetic neuropathy. **Diab Vasc Dis Res**, v. 11, n. 4, p. 218-225, 2014.

SHICHIRI, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **J Clin Biochem Nutr**, v. 54, n. 3, p. 151-60, 2014.

SHIMAZU, M.; HORIE, S.; TERASHIMA, S.; UENO, H.;MHAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan crude drug "Para-parai mí," *Phyllanthus niruri*. *Chem Pharm Bull*, v. 37, n. 2531-2532, 1989.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, v. 21, p. 227-236, 1946.

SINGAL, A.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Reversal of LPS-induced immobility in mice by green tea polyphenols: possible COX-2 mechanism. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 723-728, 2004.

SMITH, A. G.; SINGLETON, J. R. Impaired glucose tolerance and neuropathy. **Neurologist**, v. 14, n. 1, p. 23-29, 2008.

SMITH, H. S.; ARGOFF, C. E. Pharmacological treatment of diabetic neuropathic pain. **Drugs**, v. 71, n. 5, p. 557-589, 2011.

SPALLONE, V. Management of painful diabetic neuropathy: guideline guidance or jungle? **Curr Diab Rep**, v. 12, n. 4, p. 403-413., 2012.

TAGUCHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes Cells**, v. 16, n. 2, p. 123-140, 2011.

TALBOT, S.; CHAHMI, E.; DIAS, J. P.; COUTURE, R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. **J Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 36, 2010.

TERASHIMA, S.; SHIMAZU, M.; NAKAYAMA, H.; ISHIKURA, M.; UEDA, Y.; IMAI, K.; SUZUI, A.; MORITA, N. Studies on aldose reductase inhibitors from medicinal plant of "sinfito," *Potentilla candicans*, and further synthesis of their related compounds. *Chem Pharm Bull*, v. 38, n 10, p. 2733-2736, 1990.

TERASHIMA, S.; SHIMAZU, M.; HORIE, S.; MORITA, N. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. IV. Constituents and aldose reductase inhibitory effect of *Chrysanthemum morifolium*, *Bixa orellana* and *Ipomoea batatas*. *Chem Pharm Bull*, v. 39, v. 12, p. 3346-3347, 1991.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J.; DIKENSON, A. H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care**, v. 36, n. 9, p. 2456-2465, 2013.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. 1005-1028, 2000.

TOMAZ, V. S.; CORDEIRO, R. C.; COSTA, A. M. N.; DE LUCENA, D. F.; NOBRE, H. V, et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-246, 2014.

TSAI, P. F. Predictors of distress and depression in elders with arthritic pain. **J Adv Nurs**, v. 51, n. 2, p. 158-165, 2005.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of Ellagic Acid and 2-(2,3,6-Trihydroxy-4-carboxyphenyl)ellagic acid on sorbitol accumulation *in vitro* and *in vivo*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1584-1587, 2004.

UNGVARI, Z.; BAILEY-DOWNS, L.; GAUTAM, T.; JIMENEZ, R.; LOSONCZY, G.; ZHANG, C.; BALLABH, P.; RECCHIA, F. A.; WLIKERSON, D. C.; SONNTAG, W. E.; PEARSON, K.; CABO, R.; CSISZAR, A. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, p. 1133-1140, 2011.

UZAR, E.; ALP, H.; CEVIK, M. U.; FIRAT, U.; EVLIYAOGU, O.; TUFEK, A.; ALTUN, Y. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurological sciences**, v. 33, n. 3, p. 567-574, 2012.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAUZOUR, D. Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-16, 2012.

VEVES, A.; BACKONJA, M.; MALIK, R. A. Painful diabetic neuropathy: epidemiology, natural history, early diagnosis, and treatment options. **Pain Med**, v. 9, n. 6, p. 660-674, 2008.

VINIK A. I. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. **Am J Med**, v. 30, n. 107(2B), 1999.

VINIK, A. I.; NEVORET, M. L.; CASELLINI, C.; PARSON, H. Diabetic neuropathy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 42, n. 4, p. 747-787, 2013.

WANG, R.; XU, Y.; WU, H. L.; LI, Y. B.; LI, Y. H.; GUO, J. B.; LI, X. J. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT1 and 5-HT2 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 578, n. 1, 2007.

WANG, C.; WU, H. M.; JING, X. R.; MENG, Q.; LIU, B.; ZHANG, H.; GAO, G. D. Oxidative parameters in the rat brain of chronic mild stress model for depression: relation to anhedonia-like responses. **Journal of Membrane Biology**, v. 245, n. 11, p. 675-681, 2012.

WANG, D.; COUTURE, R.; HONG, Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 728, p. 59-66, 2014.

WANG, X.; MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci**, v. 2, n. 12, 2010.

WARRINGTON, S. J.; PADGHAM, C.; LADER, M. The cardiovascular effects of antidepressants. **Psychological Medicine Monograph Supplement**, v. 16, 40p, 1989.

WATSON, C. P.; MOULIN, D; WATT-WATSON, J.; GORDON, A; EISENHOFER, J. Controlled-release oxycodone relieves neuropathic pain: a

WAYHS, C. A.; MANFREDINI, V.; SITTA, A.; DEON, M.; RIBAS, G., et al. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. **Metabolic Brain Disease**, v. 25, n. 3, p. 297-304, 2010.

WAYS. C. A.; MESCKA, C. P.; VANZIN, C. S.; RIBAS, G. S.; GUERREIRO, G., et al. Brain effect of insulin and clonazepam in diabetic rats under depressive-like behavior. **Metab Brain Dis**, v. 28, n. 4, p. 563-570, 2013.

WOLFF, R. F.; BALA, M. M.; WESTWOOD, M.; KESSELS, A. G., KLEIJNEN, J. 5% lidocaine medicated plaster in painful diabetic peripheral neuropathy (DPN): a systematic review. **Swiss Med Wkly**, v. 140, n. 21-22, p. 297-306, 2010.

XU, Y.; ZHANG, L.; SHAO, T.; RUAN, L., et al. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: behavioral and neurobiological analyses. **Metab Brain Dis**, v. 28, n. 4, p. 571-583, 2013.

YI, X.; MAEDA, N. α -Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2238-2244, 2006.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. J. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 7, p. 543-552, 2005.

ZANOVELI, J. M.; DE MORAIS, H.; DA SILVA DIAS, I. C.; SCHREIBER, A. C.; DE SOUZA, C. P.; DA CUNHA, J. M. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. **Curr Diabetes Rev**, 2015.

ZATECHKA, D. S.; KADOR, P. F.; GARCIA-CASTINEIRAS, S.; LOU, M. F. Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. **Diabetes**, v. 52, p. 1014-1022, 2003.

ZHANG, L.; JOHNSON, D.; JOHNSON, J. A. Deletion of Nrf2 impairs functional recovery, reduces clearance of myelin debris and decreases axonal remyelination after peripheral nerve injury. **Neurobiol Dis**, v. 54, p. 329-338, 2013.

ZIEGLER, D. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, suppl. 1, p. 52-57, 2008.

ZILLIOX, L.; RUSSELL, J. W. Treatment of diabetic sensory polyneuropathy. **Curr Treat Options Neurol**, v. 13, n. 2, p. 143-159, 2011.

ZOCHODNE, D. W. Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. **Muscle Nerve**, v. 36, n. 2, p. 144-166, 2007.

ZHU, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; ZWEIER, J .L.; LI, Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **FEBS Letters**, v.579, n.14, p. 3029-3036, 2005.

ZUREK, J. R.; NADESON, R.; GOODCHILD, C. S. Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. **Pain**, v. 90, n. 1-2, p. 57-63, 2001.